PHARMAZEUT. CHEMIE

ÜBER DEN MECHANISMUS DER UMWANDLUNG VON FETT IN KOHLENHYDRATE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER PHILOSOPHISCHEN UND NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER
WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNSTER

VORGELEGT VON

EMMI SCHROEDER

AUS BIELEFELD IN WESTFALEN

1937

DRUCKAUSFÜHRUNG: BUCHDRUCKEREI FRANZ GRUBE, WERNE A. D. LIPPE

Tage der mündlichen Prüfung: 22. und 24. Februar 1937

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Trier

Referent: Herr Prof. Dr. H. Kaufmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547223_0096

Ueber den Mechanismus der Umwandlung von Fett in Kohlenhydrate.

Die Frage der Umwandlung von Fett in Zucker hat die gesamte Stoffwechselforschung in den letzten Jahrzehnten aufs Lebhafteste beschäftigt. Die Ansicht der einen Gruppe von Physiologen ging dahin, daß eine Umwandlung von Fett in Zucker theoretisch möglich sei. Es wurden die gewagtesten Hypothesen aufgestellt, die den Mechanismus dieser Umwandlung dartun sollten.

Die zweite Gruppe von Forschern lehnte die Möglichkeit einer Umwandlung von Fett in Zucker grundsätzlich ab, u. a. Thannhauser[1]) und Lusk[2]). Thannhauser meint, daß Formulierungen bezüglich dieser Umwandlung möglich seien, ein experimenteller Hinweis jedoch bis jetzt nicht gefunden und an keiner Stelle bisher ein sicherer Beweis dafür erbracht worden sei. Lusk sieht sogar die Zuckerbildung aus Fett als einen „wissenschaftlichen Aberglauben" an. Geelmuyden[3]), der wie Thannhauser die zahlreichen, bis dahin vorliegenden Untersuchungen einer kritischen Prüfung unterwarf, kam zu der Schlußfolgerung, daß Fette im Organismus tatsächlich in Kohlenhydrate umgewandelt werden, da der tierische Organismus wahrscheinlich nur dann Fette verwerten könne, wenn er sie vorher in Kohlenhydrate überführt habe. In allen Fällen wurden Fütterungsversuche an lebenden Tieren angestellt, die infolge zweckentsprechender Vorbehandlung ihre Kohlenhydratreserven fast vollständig eingebüßt hatten. Untersucht wurde meist der Glykogengehalt der Leber oder die Zuckerausscheidung im Harn.

---

[1]) Thannhauser: Deutsch. med. Wochenschrift 53, S. 1676, 1927 Lehrb. des Stoffwechsels u. d. Stoffwechselerkrankungen, Bergmann, München, 1929.

[2]) Lusk: Bioch. Zeitschr. 156, 334, 1925 Journ. of Biol. Chem. 20, 555, 1915.

[3]) Geelmuyden: Ergebnisse der Physiol., 21, 274, 1923. Ergebnisse der Physiol., 22, 51, 1923.

Gegen die Beweiskraft dieser Versuche wurde von der anderen Seite eingewandt, daß eine Steigerung der Zuckerausscheidung im Harn bezw. Erhöhung des Leberglykogengehaltes auf eine Mobilisierung der Kohlenhydratreserven im Muskelgewebe zurückzuführen sei, also lediglich auf einer Verschiebung des Zuckers im Organismus beruhe. Auch die unseres Erachtens beweiskräftigen Versuchsergebnisse von Calvo-Criado[4]) aus Ashers Institut sind für die Gegner der Theorie noch nicht ausreichend.

Durch Vorbehandlung mit Pepton, dauernde Zufuhr von Schilddrüsenstoffen und Phlorrhizininjektion werden Ratten kohlenhydratfrei gemacht, der Ansatz von Leberglykogen verhindert und eine dauernde Zuckerausscheidung hervorgerufen. Zusatz von Fett zur Nahrung bewirkt sofort nach der Eingabe eine starke Vermehrung der Zuckerausscheidung. Trotz dieser vermehrten Ausscheidung bleibt die Stickstoffausscheidung konstant oder ist sogar vermindert. Zucker muß also aus dem Fett gebildet worden sein. Eine Entstehung aus Eiweiß kommt hierbei nicht in Betracht.

Ein geringfügiger Zusatz von Rohrzucker zur Nahrung steigert die Zuckerbildung aus Fett sehr erheblich. Das beruht wahrscheinlich darauf, daß durch den kleinen Zuckerzusatz die Leber in einen hinreichend funktionstüchtigen Zustand für die genannte Umbildung versetzt wird. Gerade die Funktionstüchtigkeit der Leber ist in allen Fütterungsversuchen nicht genügend berücksichtigt worden. Man kann z. B. nicht verlangen, daß ein Tier, das sich längere Zeit im Hungerzustande befand, plötzlich auf eine einseitige Ernährung mit Fett hin Glykogen in der Leber ansetzen soll. Glykogenbildung in der Leber ist doch lediglich der Ausdruck dafür, daß der Organismus sich in einer ausgeglichenen Stoffwechsellage befindet, die aber bei einseitiger Ernährung durch Fett unter Ausschluß von Eiweißstoffen nicht gewährleistet ist. Die Fütterungsversuche am lebenden Tier waren also sämtlich unphysiologisch aufgebaut, ein Vorwurf, den die Tierexperimentatoren wiederum geltend machten, wenn die Möglichkeit erwogen wurde, die strittigen Stoffwechselprobleme an überlebenden Organen getöteter Tiere zu lösen versuchen. Trotzdem führte dieser Weg, wie Haarmann[5]) zeigte, zum Ziel.

Haarmann konnte den Nachweis erbringen, daß Buttersäure und in stärkerem Umfange β-Oxybuttersäure die Milchsäure-

---

[4]) Calvo-Criado: Bioch. Zeitschrift 164, 76, 1925.
[5]) Haarmann: Bioch. Zeitschr. 282, 406, 1935.

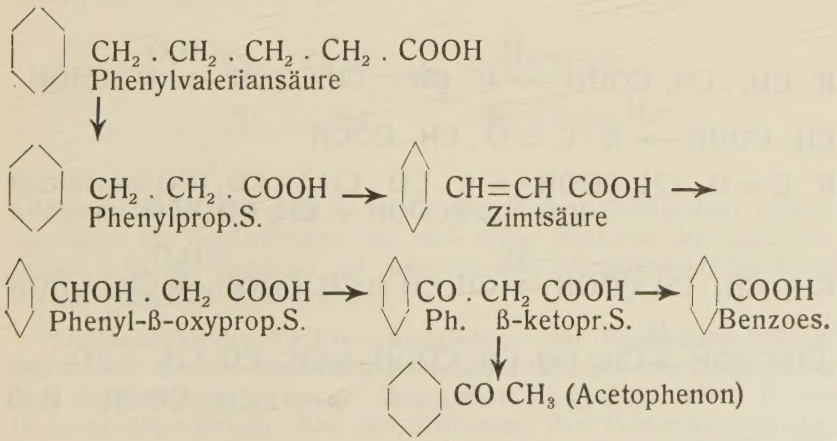
bildung in überlebendem Organ anregten. Hierbei nahm der Gesamtkohlenhydratgehalt (in folg. G. K. H.) des Gewebes nicht in dem Maße ab, wie Milchsäure gebildet wurde. Die Milchsäure kann also nur zu einem Teil aus Kohlenhydraten stammen, der Ueberschuß entfällt mithin auf die zugesetzten Fettsäuren. Da die Milchsäure leicht in Zucker umgewandelt wird, ist hiermit der Uebergang von Fett in Zucker erwiesen.

Der Nachweis der Umwandlung von Fett in Kohlenhydrat ist vor allem in den Organen sehr beweiskräftig, die, wie z. B. Hirngewebe, nur über einen äußerst geringen Gehalt an K. H. verfügen.

Ueber den Mechanismus der Zuckerbildung aus Fett sagen die Versuche von Haarmann nichts aus. Dieser Frage gelten die vorliegenden Untersuchungen.

Nach der K n o o p'schen [6]) Theorie der β-Oxydation werden die höheren Fettsäuren unter intermediärer Bildung von Ketonsäuren durch ständige Verkürzung um je zwei Glieder abgebaut.

Die Ketonsäuren und die dazwischenliegenden Oxydationsstufen werden nach der W i e l a n d'schen [7]) Dehydrierungstheorie aus den entsprechenden normalen Fettsäuren gebildet. Diese werden zunächst zu ungesättigten Säuren dehydriert, dann durch Wasseranlagerung in den entsprechenden Oxy-Säuren und durch weitere Dehydrierung in die Ketonsäuren umgewandelt.



[6]) Knoop: Hofmeisters Beiträge 6, 150, 1905.

[7]) Wieland: Ergebnisse der Physiologie 20, 477, 1922.

Daß tatsächlich die erste Phase des Abbaues auf einer Dehydrierung beruht, geht aus Fütterungsversuchen von Dakin[8]) mit niedrigen aromatischen Fettsäuren hervor. Er konnte nach Verabreichung von Phenylpropionsäure und Phenylvaleriansäure außer Zimtsäure Phenyl-β-oxypropionsäure, Phenyl-β-ketopropionsäure bezw. Acetophenon und Benzoësäure aus dem Harn isolieren. Es wurden also sämtliche Abbaustufen aus der Phenylpropionsäure nachgewiesen.

Embden, Salomon und Schmidt[9]) stellten fest, daß der Acetongehalt der Leber bei normalen Tieren im Durchströmungsblut in β-Oxybuttersäure und Normalbuttersäure ansteigt, und zwar stärker bei β-Oxybuttersäure als bei Normalbuttersäure.

Friedmann und Maase[10]) fanden bei der Leberdurchblutung mit Crotonsäure eine Bildung von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure.

Die Ketonsäuren werden im Organismus durch chemische Agentien entweder durch Keton- oder durch Säurespaltung abgebaut. Eine Ketonspaltung läßt sich im Körper nur bei den niedrigsten Ketonsäuren nachweisen, hierfür kommt wahrscheinlich nur die Acetessigsäure in Betracht. Hierbei ist die Ketonspaltung nur eine Nebenreaktion, während die Hauptreaktion nach der Ansicht von Knoop und der meisten Physiologen die Säurespaltung ist.

$$R \cdot CH_2 \cdot CH_2\ COOH \xrightarrow{-{}_2H} R \cdot CH = CH\ COOH \xrightarrow{+H_2O} R \cdot CHOH \cdot CH_2\ COOH \xrightarrow{-{}_2H} R \cdot C = O \cdot CH_2\ COOH$$

$$R \cdot C = O \cdot CH_2\ COOH \begin{cases} \rightarrow R \cdot CO \cdot CH_3 + CO_2 \text{ (Ketonspaltung)} \\ +H_2O \rightarrow RCOOH + CH_3\ COOH \text{ (Säurespalt.)} \end{cases}$$

$$CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2\ COOH \xrightarrow{-H_2} CH_3\ CH = CH \cdot\ COOH \xrightarrow{+H_2O} CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2COOH \xrightarrow{-H_2} CH_3 \cdot CO \cdot CH_2\ COOH \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 + CO_2$$
$$\searrow + 2\ CH_3 \cdot COOH + H_2O$$

---

[8]) Dakin: Journ. of Biol. Chem. 4, 419, 1908; 6, 203, 221, 1909.

[9]) Embden, Salomon und Schmidt: Hofmeisters Beiträge, 8, 129, 1906.

[10]) Friedmann und Maase: Bioch. Zeitschr. 55, 450, 1913.

Für diese Anschauungen spricht, daß das Aceton im Körper nicht verbrannt wird. Diese Ketonspaltung der Acetessigsäure in Aceton und CO_2 stellt für den diabetischen Organismus einen sehr wichtigen Entgiftungsvorgang dar, durch den er sich der sauren Aequivalente entledigt und damit Alkali für den Kohlensäure-Abtransport zurückgewinnt. Bei der Säurespaltung müßte Essigsäure frei werden.

Das Endprodukt des Fettsäureabbaues wäre nach der Knoop'schen Auffassung also die Essigsäure.

Die theoretisch zu fordernde Essigsäure ist weder als Abbauprodukt der Acetessigsäure noch der höheren Fettsäuren jemals im Organismus nachgewiesen worden. Es ist das umso auffallender, als die Essigsäure im Körper relativ schwer verbrannt wird. Es ist chemisch schwer einzusehen, daß die in der Zelle aus intermediären Stoffwechselvorgängen herrührende Essigsäure leichter verbrannt werden soll als das bei Untersuchungen zugeführte Acetat. Gegen die Annahme der Essigsäure als Zwischenstufe des Fettsäureabbaues spricht ferner die Tatsache, daß das die Essigsäure abbauende Ferment, das von Thunberg[11]) aufgefunden wurde, ein sehr schwach wirkendes Ferment ist, wo man doch fordern müßte, daß es eines der mächtigsten Fermente des Körpers wäre.

Thunberg stellte die Hypothese auf, daß sich 2 Moleküle Essigsäure unter Dehydrierung zu einem Molekül Bernsteinsäure zusammen lagern.

$$\begin{array}{l} CH_3\ COOH \\ CH_3\ COOH \end{array} \xrightarrow{-2H} \begin{array}{l} CH_2\ COOH \\ | \\ CH_2\ COOH \end{array}$$

Auch Wieland (l. c.) zieht aus thermochemischen Ueberlegungen die Schlußfolgerung, daß diese Reaktion thermodynamisch sehr gut denkbar sei, wie aus den Affinitätsverhältnissen dieses Vorgangs hervorgeht.

Die molukulare Verbrennungswärme der Essigsäure beträgt 209,4 Cal., die der Bernsteinsäure 358,8 Cal. Bei der Entstehung der Bernsteinsäure aus 2 Molekülen Essigsäure wird je ein H-Atom abgespalten. Aus der Differenz der Verbrennungswärmen ergibt sich der Wärmewert der beiden H-Atome.

---

[11]) Thunberg: Skand. Arch. für Physiol. 40, 1920.

418,8 — 356,8 = 62,0 Cal. = Oxydative Dehydrierungswärme.

Die Hydrierungswärme ist gleich der Differenz aus der Bildungswärme des Wasser = 68,4 und der oxydativen Dehydrierungswärme. Sie beträgt für Bernsteinsäure

68,4 — 62,0 = 6,4 Cal.

Die beiden überständigen H-Atome der Essigsäure haften also nur sehr lose, wie auch eine Gegenüberstellung mit anderen Substanzen, z. B. Alkohol und Hydrochinon, lehrt.

$$2\,CH_3\,COOH \xrightarrow{-2\,H} HOOC\,.\,CH_2\,.\,CH_2\,COOH \quad -6\ \text{Cal.}$$

$$CH_3\,.\,CH_2OH \xrightarrow{-2\,H} CH_3C\begin{matrix}=O\\ \diagdown H\end{matrix} \quad -21\ \text{Cal.}$$

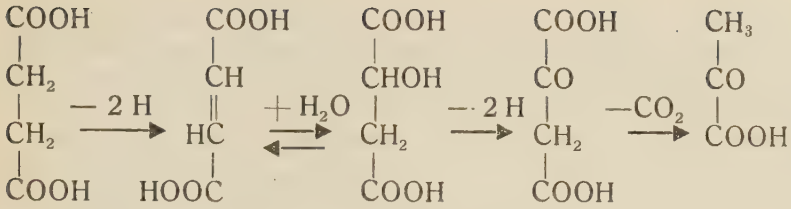
$$C_6H_4(OH)_2 \xrightarrow{-2\,H} C_6H_4(=O) \quad -42\ \text{Cal.}$$

Diese Hypothese ist an sich sehr einleuchtend, würde sie doch einmal das spurlose Verschwinden der Essigsäurereste erklären, dann auch eine Erklärung dafür abgeben, daß das Bernsteinsäure abbauende Ferment unter allen Fermenten des Körpers das stärkste und stabilste ist. Hinzu kommt noch, daß die chemischen Oxydationsprodukte der Essigsäure Glyoxalsäure und Oxalsäure vom Körper nur in nicht nennenswertem Umfang abgebaut werden und für den Organismus außerdem sehr giftig sind.

Sehr eingehend untersucht ist der Abbau der Bernsteinsäure. Vorweggenommen sei, daß die Bernsteinsäure und auch die Fumarsäure ein regelmäßiger Bestandteil des frischen Fleisches sind, wie die Untersuchungen von Einbeck[12]) gezeigt haben. Beide Säuren sind also immer vorhandene Zellbestandteile. Der Abbau der Bernsteinsäure ist von Hahn und Haarmann[13]) in all seinen Zwischenstufen sichergestellt. Sie konnten sämtliche hypothetisch geforderten Abbaustufen isolieren. Aus der Bernsteinsäure entsteht durch ausgewaschenes Muskelgewebe unter Verwendung von Methylenblau als Wasserstoffakzeptor, das dabei entfärbt wird, Fumarsäure, an die sich Wasser unter Bildung von Aepfelsäure anlagert.

[12]) Einbeck: Hoppe-Seylers Zeitschr. für Phys. Chem. 87, 145, 1913; 90, 301, 1914.
Einbeck: Bioch. Zeitschr. 95, 296, 1919.

[13]) Hahn und Haarmann: Zeitschr. für Biol. 86, 524, 1928; 87, 107, 1928; 89, 159, 1929.



Zwischen Aepfelsäure und Fumarsäure besteht ein Gleichgewichtszustand. Im ausgewaschenen Skelettmuskelgewebe bleibt der Vorgang bei der Aepfelsäure stehen, weil das die Aepfelsäure abbauende Ferment beim Auswaschen des Gewebes mit H_2O entfernt wird.

Bei Verwendung von O_2 als Wasserstoffakzeptor treten dieselben Abbauprodukte auf, wie bei der „sauerstofflosen" Oxydation mit Methylenblau. Der weitere Abbau der Aepfelsäure erfolgt durch ein spezifisch wirkendes Ferment, die Apfelsäuredehydrase. Hierbei tritt als Dehydrierungsprodukt Oxalessigsäure auf, die sich in geringem Umfang mit Semicarbazid als Semicarbazon abfangen läßt. Die Oxalessigsäure zerfällt unter CO_2-Abspaltung in Brenztraubensäure. Die Brenztraubensäure wurde nach Hahn und Haarmann ebenfalls mit Semicarzid abgefangen und als Brenztraubensäure-phenylhydrazon zur Wägung gebracht. Die Oxalessigsäure spaltet CO_2 rein chemisch ab. Dieser Vorgang ist also kein fermentativer, denn er geht ebenso schnell in gekochten wie in frischen Muskeln vor sich. Die Bildung von Brenztraubensäure aus Fumar- bezw. Aepfelsäure erfolgt in Gewebe auch ohne Zugabe eines Wasserstoffakzeptors wie Methylenblau unter rein anaeroben Bedingungen, ein Beweis dafür, daß das Gewebe selbst über genügend Wasserstoffakzeptoren verfügt, die den durch die Gewebsdehydrasen aktivierten Wasserstoff binden.

Als Zellbestandteil dieser Art kommt daß von Hopkins[14]) in Hefe, Säugetier-Leber und -Muskel entdeckte und isolierte Glutathion in Betracht, ein leicht lösliches Tripeptid, das aus Cystein Glutaminsäure und Glykokoll besteht. Wie die meisten Sulfhydrilverbindungen liefert es bei der Oxydation ein Disulfid. Die Disulfidform dient dann als intermedärer Akzeptor für den durch die Dehydrasen aktivierten Wasserstoff. Unter anaeroben Bedingungen verschwindet die Disulfidform und geht in die SH-Form über.

[14]) Hopkins: Bioch. Journ. 15, 286, 1921.

Brenztraubensäure bildet unter Hydrierung Milchsäure, die wie auch die Brenztraubensäure im Organismus leicht zu Kohlenhydraten resynthetisiert werden. Bestünde die Annahme von Thunberg zu Recht, dann wäre damit die Möglichkeit einer Umwandlung von Fett in Zucker gegeben.

Gegen die Annahme der Umwandlung von Essigsäure in Bernsteinsäure spricht die Tatsache, daß einmal, wie bereits besprochen, die Essigsäure nur schwer abgebaut wird und daß es bislang nie gelungen ist, im biologischen Versuch andere Anhaltspunkte für diese Auffassung zu gewinnen.

Wahrscheinlicher ist, daß die Essigsäure als Abbauprodukt der höheren Fettsäuren überhaupt nicht auftritt. Im Gegensatz zu Knoop ist Spiro[15]) der Ansicht, daß beim oxydativen Abbau der Fettsäure viergliedrige Reste entstehen, daß also nicht eine β-Oxydation, sondern eine δ-Oxydation die Verkürzung der Kohlenstoffkette bewirkt. Er führt vor allen Dingen das reichliche Auftreten von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure als Abbauprodukte beim Diabetiker ohne nachweisbare Essigsäurebildung an.

Einen gewissen Hinweis für die Art der abgespaltenen Reste gibt die Lage der Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren, die sich aus dem Organfett isolieren lassen. Das Leberfett des Schweines besteht nach Hartley[16]) zu etwa 50% aus ungesättigten Säuren. Die Hauptmenge entfällt auf die Linolsäure, die zwei Doppelbindungen enthält. Außer der Linolsäure isolierte er eine Säure von der Bruttoformel $C_{20}H_{32}O_2$ mit 4 Doppelbindungen, die Arachidonsäure.

Die Arachidonsäure ist ein regelmäßiger Bestandteil der Organfette. Der Gehalt der Organe an dieser Säure, besonders derjenige der Leber, steigt bei erhöhtem Fettumsatz stark an. Bei Hungertieren wird diese Steigerung besonders dann sichtbar, wenn Acetonkörper auftreten. Im Sinne Spiros soll bei den Säuren mit mehreren Doppelbindungen eine Aufspaltung an der Stelle der Doppelbindungen erfolgen, die ja als schwache Stellen im Molekül bekannt sind, und zwar derart, daß Säuren mit 4 Kohlenstoffatomen frei werden.

Bereits vor nahezu 100 Jahren wies Schönbein auf die Wahrscheinlichkeit hin, daß die Nährstoffmoleküle eine ganze Reihe von Zwischenstufen durchlaufen müssen, bis sie das Endstadium

---

[15]) Spiro: Biochem. Zeitschrift, 24, 299, 1932.

[16]) Hartley: Journ. of Physiol. 38, 353, 1909.

der Verbrennung erreicht haben. Die Erforschung dieser Zwischenstufen ist nicht leicht, dafür aber eine umso lohnendere Aufgabe der physiologischen Chemie und noch weit von der Lösung entfernt.

Wir müssen bei allem biologischen Geschehen berücksichtigen, daß anaerobe Spaltungs- und oxydative Zerfallsvorgänge mit Synthesen und Reduktionsvorgängen gleichzeitig ablaufen. Natürlich werden hierdurch die Verhältnisse beim Stoffwechsel noch bedeutend undurchsichtiger. An sich ist die Schlußfolgerung statthaft, daß, solange sich eine chemische Umsetzung im Gewebe vollzieht, sämtliche Zwischenstadien dieses Vorgangs vorhanden sein müssen.

Die direkte analytische Bestimmung der Zwischenprodukte gelingt aber nur äußerst selten, da ja bekanntlich alle Reaktionen in der Zeit verlaufen und entweder die Lebensdauer der entstehenden Stoffe wegen ihrer sofortigen Weiterverarbeitung sehr kurz sein kann, oder aber, weil die Stoffe in einer derartig geringen Menge auftreten, daß sie chemisch und experimentell nicht erfaßt werden können. Hinzu kommt noch, daß meistens nur Bestandteile abgetöteter Organe ermittelt werden. Die normalerweise in der Zelle vorkommenden Substanzen können bereits verbraucht sein und so dem Nachweis entgehen. Die Fleischmilchsäure wurde deswegen so frühzeitig aufgefunden, weil sie sich im absterbenden Gewebe anreichert. Die frische und lebende Muskulatur weist nach Fletcher und Hopkins[17]) nur einen sehr geringen Milchsäuregehalt auf.

Befindet sich eine Reaktionskette im dynamischen Gleichgewicht, dann entsprechen sich Neubildung und Verbrauch eines jeden einzelnen Zwischenproduktes. Andernfalls würde das Gleichgewicht gestört werden. Ist die Konzentration eines Stoffes erhöht, so ist damit noch nichts über seine Wichtigkeit ausgesagt, da der Ablauf einer stofflichen Umsetzung von der Konzentration der miteinander reagierenden Substanzen und deren Reaktionsgeschwindigkeit abhängt.

Der direkt analytische Nachweis von Stoffwechselzwischenprodukten führt nur bei gewissen pathologischen Zuständen zum Ziel. Der Körper hat hier die Fähigkeit eingebüßt, einzelne Nährstoffe bis zum Endstadium abzubauen. Im allgemeinen verwertet der Körper nur die Stoffe, die er normalerweise umzusetzen in der Lage ist. Werden ihm oder dem überlebenden Organ hypothetische Zwischenglieder einer Reaktionskette zu-

[17]) Fletcher und Hopkins: Journ. of Physiol. 35, 247, 1906—07.

gesetzt und tritt eine Umsetzung ein, so besteht damit der Wahrscheinlichkeitsbeweis, daß der zugesetzte Stoff auch in Wirklichkeit ein Zwischenprodukt des normalen Stoffwechsels ist. Wird ein durch theoretische Ueberlegungen wahrscheinliches Zwischenglied nicht zu denselben Endprodukten abgebaut wie der Ausgangsstoff, so wird man dieses hypothetische Zwischenglied aus der Reaktionskette streichen müssen.

Beispiele: In den Anfängen der Stoffwechselphysiologie wurde die Glukose als Zwischenprodukt des Glykogenabbaues zu Milchsäure angenommen. Nach Feststellungen von Laqueur[18]) bildet die Glukose im Skelettmuskel vom Frosch keine oder nur im geringen Umfange Milchsäure, während aus Glykogen große Mengen entstehen. Die Glukose kann also keine Zwischenstufe des Glykogenabbaues zu Milchsäure sein. Das gleiche geht aus Versuchen Haarmanns[19]) hervor, in denen er die Fähigkeit der verschiedensten Organe untersuchte, zugesetzte Kohlenhydrate u. a. Glykose und Glykogen in Milchsäure umzuwandeln. Lediglich der Skelettmuskel baut Glykogen leicht zu Milchsäure ab, während der Herzmuskel oder die übrigen Organe Glykogen nur in geringem Maße zur Milchsäurebildung heranziehen. Diese Organe verwerten in erster Linie Glukose.

Die Leber nimmt eine Sonderstellung ein. Sie vermag weder Glukose noch Glykogen in Milchsäure zu überführen.

Trotz eines fehlenden Milchsäurebildungsvermögens sind sämliche Organe, wie eine weitere Arbeit Haarmann[20]) zeigte, fähig, das Glykogen zu reduzierenden Zuckern zu hydrolysieren. Die in den einzelnen Organen entstehenden enzymatischen Hydrolyseprodukte des Glykogens verhalten sich im Stoffwechsel grundsätzlich verschieden. Sie werden nur von den Organen zu Milchsäure abgebaut, die, wie der quergestreifte Muskel, auch aus Glykogen Milchsäure bilden. Ganz anders verhält sich der bei der Glykogenhydrolyse in der Leber entstehende Zucker. Er bewirkt nur in den Organen eine gesteigerte Milchsäurebildung, in denen das auch für Glukose der Fall ist.

Es kann also aus diesen Versuchen gefolgert werden, daß der in der Leber aus Glykogen entstehende Zucker mit Glukose identisch ist, nicht aber der in den übrigen Organen aus dem Glykogen hervorgehende Zucker.

---

[18]) Laqueur: Zeitschr. für phys. Chem. 116, 169, 1921; 122, 26, 1922.
[19]) Haarmann: Bioch. Zeitschr. 255, 103, 1932.
[20]) Haarmann: Bioch. Zeitschr. 255, 142, 1932.

Eine sehr brauchbare Methode zur Isolierung von intermediären Stoffwechselprodukten ist das sogenannte Abfangverfahren. Es beruht darauf, daß man die entstehenden Verbindungen durch Zusatz von Stoffen, die sich mit ihnen verbinden, vor dem weiteren Abbau schützt.

Dieses Verfahren hat besonders bei der Erforschung von Gärungserscheinungen, wie z. B. zum Abfangen des Acetaldehyds *) große Dienste geleistet.

Die Ausscheidung des Acetaldehyds aus der Reaktionskette wird durch Bindung von saurem Natriumsulfit oder Calziumsulfit, das sich ja an Aldehyde und Ketone anlagert, erreicht. Aldehyde und nicht Ketone werden mit Dimedon (Dimethylhydroresorcin) abgefangen.

Die Brenztraubensäure wurde so von Hahn und Haarmann [21]) zum ersten Male im tierischen Organismus als Abbauprodukt der Milchsäure, Aepfelsäure, Fumarsäure, Zitronensäure, Hexosediphosphorsäure, Glycerinphosphorsäure, Propionsäure, Hexosemonophosphorsäure und Adenylsäure nachgewiesen. Sie wurde mit Semicarbacid als Semicarbazon abgefangen. Glycerin bewirkt keine Vermehrung der Brenztraubensäure, Fruktose nur eine sehr geringe, während Glycerinphosphorsäure und Fruktosediphosphorsäure sehr stark wirksam sind.

Das Verfahren ist geeignet, in den Mechanismus der intermediären Stoffumwandlungen Einblicke zu tun. So zeigen die Versuche von Hahn und Haarmann (l. c.) unter anderem, daß Glycerin und Fruktose erst mit Phosphorsäure verestert sein müssen, bevor sie den weiteren Abbau zugänglich sind. Diese Veresterung mit Phosphorsäure scheint auch für die höheren Fettsäuren Vorbedingung für die Resorption und den weiteren Abbau zu sein. Wie Willbrandt und Laßt [22]) sowie Verzâr [23]) zeigen konnten, werden Neutralfette sowie auch die gewöhnlichen Hexosen, Glukose, Fruktose, Galactose erst nach Phosphorylierung aufgenommen. Bei Vergiftung des phosphorylierenden Fermentes, der Phosphatase, durch Phlorrhizin und Monojodessigsäure findet keine Resorption statt. Für diese Annahme spricht weiterhin der Umstand, daß während der Ver-

*) Neuberg: Berichte der Physiologie, 55, 3624, 1932.

21) Hahn und Haarmann: Zeitschr. für Biologie, 88, 587, 1929 89. 563, 1930; 90, 231, 1930; 91, 315, 1931.

22) Wilbrandt und Laßt: Bioch. Zeitschr. 259, 398, 1933.

23) Verzar: Bioch. Zeitschr. 270, 24, 35, 1934; 276, 1, 1935.

dauung der Gehalt der Lymphe an Phosphatiden stark ansteigt. Daß die Phospatide fernerhin erst gebildet werden müssen, bevor das Neutralfett verbrannt wird, geht aus der bekannten Tatsache hervor, daß die ungesättigten Fettsäuren vorzugsweise in Phosphatiden enthalten sind und daß im Hungerzustand die Zahl der ungesättigten Bindungen vermehrt wird.

Das Abfangverfahren führt leider nur in wenigen Fällen zum Ziel. Das ist einmal darin begründet, daß im allgemeinen nur Aldehyde und Ketone sich chemisch fixieren lassen. Dann aber auch, daß die benutzten Abfangmittel meist für das Gewebe zu giftig sind, sodaß dadurch jegliche Fermenttätigkeit unterbunden wird. Hinzu kommt noch, daß die Bindung der Substanz an das Abfangmittel Zeit erfordert, sodaß der Stoff bereits weiter verarbeitet ist, bevor er abgefangen ist. So entstehen z. B. beim Abbau der Zucker intermediär Aldehyde und Ketone, und lediglich die Brenztraubensäure wird vom Semicarbacid festgehalten, obgleich in vitro alle Aldehyde Semicarbarzone bilden.

Ein Fortschritt für die Untersuchung der Gewebsoxydation war die Einführung der sog. Thunberg'schen [24]) Methylenblaumethode, die sich auf die Wieland'sche [25]) Dehydrierungstheorie stützt.

Im Jahre 1913 stellte H. Wieland die Theorie auf, daß die Oxydationsvorgänge im Gewebe nicht dadurch zustandekommen, daß die oxydablen Substanzen 0_2 aufnehmen, sondern Wasserstoff abspalten. Der Sauerstoff hat lediglich die Aufgabe, den durch spezifisch wirkende Dehydrasen aktivierten Wasserstoff zu binden. Er dient als nicht spezifischer Akzeptor für aktivierten Wasserstoff, ohne in den Komplex des oxydierten = dehydrierten Substratmoleküls zu treten. Die Oxydationsvorgänge sind nach Wielands Ansicht Dehydrierungsvorgänge, die das gleiche Endprodukt liefern. Eine Aktivierung des Sauerstoffs findet nach seiner Ansicht nicht statt. Besteht diese Annahme zu Recht, dann muß die Dehydrierung eines Stoffes auch dann vor sich gehen, wenn der Sauerstoff durch geeignete andere Wasserstoffakzeptoren ersetzt wird, die, wie z. B. Farbstoffe, Wasserstoff leicht unter Entfärbung addieren. Es ist in der Tat *) gelungen, eine ganze Reihe von sog. Oxydationen sauerstofflos durchzuführen.

---

[24]) Thunberg: Siehe S. 7.

[25]) Wieland: Chemische Berichte 46, 3327, 1913.

*) Wieland: Ergebnisse der Physiologie, 20, 475, 1922.

Auf die Oxydationsvorgänge in der Zelle angewandt, konnten Hahn und Haarmann in den oben erwähnten Arbeiten für eine ganze Anzahl von Stoffen diesen Nachweis erbringen. Es hat sich dabei gezeigt, daß Methylenblau alle Verbindungen, die als intermediäre Stufen bei der Oxydation der Nährstoffe erkannt sind, unter anaeroben Bedingungen zu dehydrieren imstande ist. Damit ist der Wahrscheinlichkeitsbeweis erbracht, daß sich sämtliche intermediären Stoffwechselprodukte unter geeigneten Bedingungen und bei Anwesenheit der spezifisch wirkenden Dehydrasen Methylenblau gegenüber als „Donatorsubstanzen" verhalten werden.

Das Methylenblauverfahren zeichnet sich durch große Einfachheit der technischen Ausführung und Genauigkeit aus und läßt sich bereits mit geringen Gewebsmengen ausführen. Es wird lediglich die Zeit ermittelt, die notwendg ist, um eine gegebene Menge Methylenblau unter dem Einfluß einer Suspension von feinverteiltem Gewebe und der zu untersuchenden Donatorsubstanz im Vakuum zu entfärben. Die Entfärbungsmethode ist allen anderen Methoden an Empfindlichkeit weit überlegen. Mit dem gasanalytischen Verfahren gelingt es z. B. nicht, eine Oxydation von Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure nachzuweisen, während die Methylenblaumethode eine Dehydrierung anzeigt. Mit H_2O extrahiertes Gewebe oder die Donatorsubstanz besitzen kein Entfärbungsvermögen.

Ein solcher entfärbender Prozeß ist gebunden an die Anwesenheit eines sog. chemisch-katalytischen Dreikörpersystems, in dem die Donatorsubstanz von dem zu untersuchenden Stoff, die Akzeptorsubstanz von Methylenblau und der Katalysator von den von der Zelle gelieferten spezifisch wirkenden Fermenten dargestellt werden. Bei Fehlen einer dieser drei Komponenten ist eine Umsetzung unmöglich. Durch mit Wasser stark extrahiertes Gewebe findet, wie schon erwähnt, keine Entfärbung statt, weil durch das Auswaschen die Nährstoffe aus der Zelle entfernt sind und gleichzeitig die Mehrzahl der Fermente. Erhalten geblieben sind u. a. die Fermente, die den Abbau der Bernsteinsäure, Hexosediphosphorsäure und Glycerinphosphorsäure katalysieren, während das Hexosemonophosphorsäure abbauende Ferment verlorengeht. Zusatz von Bernsteinsäure zum ausgewaschenen Skelettmuskel führt zu einem Abbau der Bernsteinsäure in Gegenwart von Methylenblau.

Um Auskunft darüber zu erhalten, welche Zwischenstufen auf dem Wege von β-Oxybuttersäure zur Milchsäure durchlaufen werden, ist es notwendig, sich zunächst einmal rein theoretisch evtl. Abbaustufen abzuleiten.

Buttersäure geht durch Dehydrierung in Crotonsäure über. Diese lagert Wasser an unter Bildung von β-Oxybuttersäure, die zu Acetessigsäure dehydriert wird. Da die β-Oxybuttersäure und die Acetessigsäure bei gestörtem Fettabbau auftreten, so sind sie als intermediäre Abbauprodukte der Fette anzusehen. Zerfiele die Acetessigsäure, wie bislang angenommen wurde, nach der von Knoop aufgefundenen Regel der β-Oxydation unter Bildung von 2 Molekülen Essigsäure, so wäre eine Bildung von Milchsäure nicht denkbar. Die Oxydation der Acetessigsäure muß vielmehr am α-Kohlenstoffatom einsetzen. Eine Oxydation am α-Kohlenstoffatom wird von Knoop abgelehnt. Gegen diese Ansicht spricht der Umstand, daß nach den Untersuchungen von Blum und Woringer[26]) Hunde nach Zufuhr von Propionsäure Milchsäure ausscheiden, und daß nach Versuchen von Ringer[27]) Propionsäure beim Phlorrhizintier sich als Zuckerbildner erwiesen hat. Hahn und Haarmann[28]) fanden nach Zusatz von propionsaurem Natrium eine Zunahme der Brenztraubensäurebildung im Skelettmuskel. Haarmann[29]) konnte eine vermehrte Milchsäurebildung aus Propionsäure im Gewebe feststellen. Damit ist nachgewiesen worden, daß der Organismus eine Oxydation einer Fettsäure auch in α-Stellung durchführen kann.

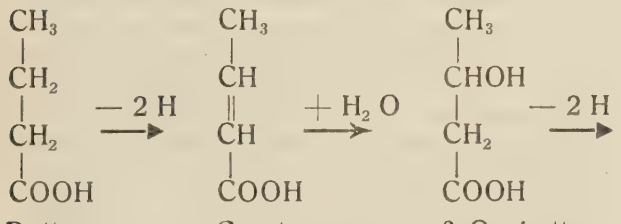
Nach unserer Annahme geht der weitere Abbau der Acetessigsäure in der Weise vor sich, daß an die Enolform der Acetessigsäure Wasser an die Doppelbindung angelagert wird unter Bildung von Dioxybuttersäure. Bei gestörtem Fettabbau, z. B. beim Diabetes, reicht die Leistungsfähigkeit des wasseranlagernden Fermentes nicht aus, um diese Umsetzung zu vollziehen. Die eigentliche Störung läge also an dieser Stufe des Fettsäureabbaues. Die Acetessigsäure häuft sich jetzt im Gewebe an und zerfällt rein chemisch in Aceton und CO_2. Die α-β-Dioxybuttersäure liefert beim diabetischen Hund kein Aceton, wird also anders abgebaut wie die β-Oxybuttersäure, wie Untersuchungen von Friedmann und Maase[30]) erwiesen haben. Diese Säure wird vom Organismus leicht abgebaut und liefert hierbei „Extraglukose". Besteht die Annahme zu Recht, daß die Dioxybuttersäure eine Zwischenstufe auf dem Wege von β-Oxybuttersäure zur Milchsäure ist, dann muß verlangt werden, daß die Ausbeute an Milchsäure bei Zusatz von Dioxybuttersäure

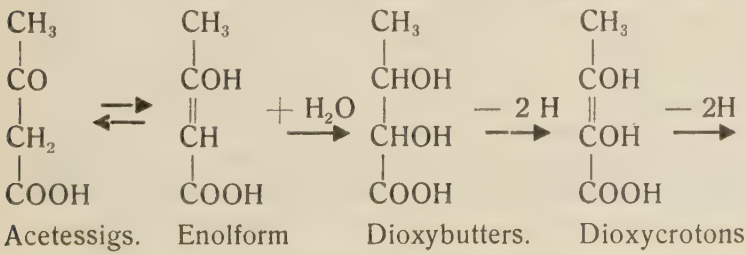
---

[26]) Blum und Woringer: Bulletins Société de Chim. Biol. 2, 88, 1920.
[27]) Ringer. Journ. of Biol. Chem. 12, 511, 1912.
[28]) Hahn und Haarmann: Zeitschr. für Biol., 90, 231, 1930.
[29]) Haarmann: Bioch. Zeitschr. 256, 326, 1932.
[30]) Friedmann und Maase: Bioch. Zeitschr. 27, 116, 1910.

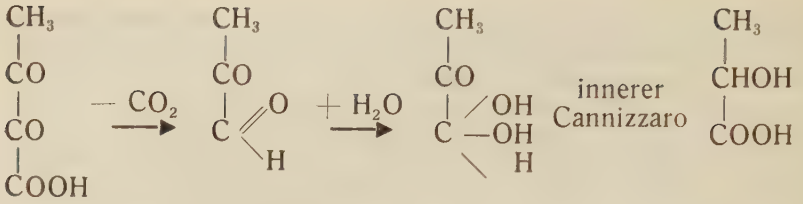
größer ist als bei β-Oxybuttersäure, weil die Dioxybuttersäurestufe der Milchsäure näher ist als die der β-Oxybuttersäure. Es sei hier noch angeführt, daß auch die β-Oxybuttersäure mehr Milchsäure liefert als Buttersäure aus dem gleichen Grunde. Die Dioxybuttersäure unterliegt dann einer erneuten Dehydrierung, wobei Dioxycrotonsäure entsteht; die Dioxycrotonsäure wird dann weiterhin zur Diketobuttersäure dehydriert. Diese Säure, die chemisch bislang noch nicht dargestellt wurde, sondern nur in Form ihrer Ester bekannt ist, zerfällt rein chemisch in Methylglyoxal und CO_2. Das Methylglyoxal wiederum wird durch ein in allen tierischen Geweben vorkommendes Ferment, das von Neuberg[31]) und gleichzeitig von Dakin und Dudley[32]) entdeckt wurde, in Milchsäure verwandelt. Dieses Ferment bezeichnen Neuberg als Keton-Aldehydmutase, Dakin und Dudley als Glyoxalase. Das aus Methylglyoxal durch Wasseraufnahme entstehende Methylglyoxalhydrat geht durch eine innere cannizzarosche Reaktion in Milchsäure über.

Damit wären sämtliche Zwischenstufen von der Buttersäure bis zur Milchsäure gegeben. In folgenden Formeln sind die Zwischenstufen gezeigt:





[31]) Neuberg: Bioch. Zeitschr. 49, 502, 1913; 51, 484, 1913.
[32]) Dakin und Dudley: Journ. of Biol. Chem. 14, 155, 423, 1913.



Diketobutters. Methylglyoxal Methylglyoxalhydrat Milchs.

Wie aus dem Abbauschema hervorgeht, sind bei der Umwandlung von Fett in Zucker dehydrierende und hydratisierende Fermente wirksam. Die Annahme eines dekarboxylierenden Fermentes wird sich erübrigen, da ja Diketobuttersäure bereits rein chemisch zerfällt, ähnlich wie es auch für die Oxalessigsäure zutrifft.

Die Umwandlung wird unter anaeroben Bedingungen nur dann in genügendem Umfange erfolgen können, wenn genügend Wasserstoffakzeptoren vorhanden sind, die den aktivierten Wasserstoff binden. Durch Zufuhr von Wasserstoffakzeptoren müßte rein theoretisch die Milchsäurebildung gesteigert sein. Ein Hinweis hierfür geben uns Versuche von Haarmann und Brink[33]), die in einer Arbeit vergleichende Untersuchungen über die Milchsäurebildung und Kohlenhydratabnahme in Gewebe unter aeroben und anaeroben Bedingungen anstellten. Nach Warburg[34]) besitzt die sog. Pasteursche Reaktion für den Stoffwechsel der bösartigen Tumoren keine Gültigkeit. Die Pasteursche Reaktion besagt, daß im ausgewachsenen Gewebe Sauerstoff die Milchsäurebildung unterdrückt, im Tumorgewebe wird auch in Gegenwart von Sauerstoff aus Glukose Milchsäure gebildet. Nach Hahn und Mitarbeitern[35]) bleibt im Rindsmuskel der Milchsäuregehalt bei Sauerstoff gleich, im Vakuum dagegen erfolgt eine starke Milchsäurenachbildung aus den präformierten Kohlenhydraten des Gewebes. Nach den Versuchen von Haarmann und Brink[36]) wird im Herzmuskel die Milchsäurebildung aus Glukose durch O_2 vollkommen unterdrückt, desgl. im Skelettmuskel vom Rind. Im Skelettmuskel vom Kaninchen dagegen wird im Vergleich zu den Versuchen unter anaeroben Bedingungen die Milchsäurebildung gehemmt, während im Hirngewebe die Milchsäurebildung in O_2 von der

[33]) Haarmann und Brink: Bioch. Zeitschr. 282, 419, 1935.
[34]) Warburg: Bioch. Zeitschr. 152, 309, 1924.
[35]) Hahn, Fischbach u. Niemer: Zeitschr. für Biol. 91, 53, 1931.
[36]) Haarmann und Brink: Bioch. Zeitschr. 282, 434, 1935.

gleichen Größenordnung ist wie im Vakuum. Das Hirngewebe zeigt also ein Verhalten, wie es für die bösartigen Tumoren als charakteristisch angesehen wird.

Fumarsäure bildet unter anaeroben und aeroben Bedingungen Milchsäure, die Bernsteinsäure nur in Gegenwart von Sauerstoff. Im letzteren Falle vermögen also die im Gewebe enthaltenen Akzeptorsubstanzen die Dehydrierung der Bernsteinsäure bis zur Milchsäure nicht durchzuführen. Wir dürfen also erwarten, daß das gleiche bis zu einem gewissen Grade auch für die β-Oxybuttersäure gilt. Die Versuche mit O_2 sind weiterhin aus dem Grunde sehr beweiskräftig, da nach einer weiteren Untersuchung von Haarmann und Brink [37]) die Milchsäure im Gewebe unter anaeroben Bedingungen im gleichen Umfange abgebaut wird. Der anaerobe Milchsäureschwund, der zuerst von Haarmann [38]) aufgefunden wurde, und der oxydative Milchsäureschwund sind also gleich, sodaß die Schlußfolgerung berechtigt ist, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die Milchsäure überhaupt nicht verbrannt wird.

Ein direkter Nachweis, daß Buttersäure, β-Oxybuttersäure in Kohlenhydrat umgewandelt werden, ist in der Arbeit von Haarmann nicht erbracht, sondern nur aus der vermehrten Milchsäurebildung erschlossen, die nicht aus den im Gewebe vorhandenen Kohlenhydratreserven stammen konnte. Gemmill und Holmes [39]) stellten fest, daß der Kohlenhydratgehalt der Leber von Ratten, die ausschließlich mit Butter gefüttert wurden, anstieg, wenn die zerkleinerte überlebende Leber 3 Stunden in Bicarbonat-Ringer-Lösung bei 37° gehalten wurde. Es liegt hier also eine Umwandlung von Fett in Zucker vor.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit von Euler und Günther [40]) wurde gezeigt, daß der Kohlenhydratgehalt von Leberschnitten in einer Lösung von Lactat und Pyruvinat ansteigt. Die Resynthese der Milchsäure und Brenztraubensäure findet also auch in überlebenden Geweben statt. Eine Resynthese der Milchsäure im zerschnittenen Skelettmuskelgewebe zu Kohlenhydraten erfolgt nicht. Sie geht nur, wie Versuche von Hahn und Mitarbeitern [41]) bewiesen haben, im intakten Skelettmuskel vor sich, ebenfalls im längs zerschnittenen Muskel, bei

---

[37]) Haarmann und Brink: Siehe S. 25.

[38]) Haarmann: Bioch. Zeitschr., 256, 326, 1932.

[39]) Gemmill und Holmes: Chem. Journ. 29, 328, 1935.

[40]) v. Euler und Günther: Zeitschr. für Physiol. Chemie, 243, 1, 1936.

[41]) Hahn, Fischbach und Niemer: Zeitschr. für Biol. 92, 535, 1932.

dem die Muskelfibrillen unversehrt sind. Im querzerschnittenen Muskel findet keine Resynthese statt.

Die Versuchsanordnung ist nach dem Gesagten genau vorgezeichnet. Zu untersuchen war die Milchsäurebildung und Kohlenhydratabnahme in den verschiedensten Organen ohne Zusatz und mit Zusatz der verschiedenen Fettsäuren, β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure und vor allem Dioxybuttersäure. Eine evtl. Kohlenhydratzunahme ist nur im Lebergewebe zu erwarten.

Die Versuche waren einmal unter Sauerstoffabschluß und in Gegenwart von Sauerstoff anzustellen.

Methodik.

Versuchsanordnung:

Zu den Untersuchungen wurden Organe von Hund und Katze verwandt. Sofort nach Tötung der Tiere wurden die erforderlichen Organe, Leber, Niere Herz, Gehirn und Milz, herausgeholt, das Muskelgewebe vom Knochen abgetrennt, sämtliche Organe vom Bindegewebe, Sehnen, Haut und Fett befreit und durch eine Fleischmaschine getrieben, deren Siebscheibe Löcher von 2 mm Durchmesser hatte. Man erhielt so für alle Versuche den gleichen Gewebebrei, der nach seinem Zerkleinerungsgrad nach der Bezeichnung von Meyerhof[42]) als fein anzusehen wäre. Derselbe wurde in der gleichen Weise noch zweimal durchgedreht, um eine garantiert vollkommene Gleichheit des Gewebsgemisches zu erhalten.

Es war besonders darauf zu achten, daß sämtliches Gewebe lebendfrisch verarbeitet wurde, ehe die Fermenttätigkeit gestört war.

Die Menge des für die Versuchsansätze benötigten Gewebebreies war je nach Art und Größe des verfügbaren Organs verschieden.

Als Beispiel soll eine Versuchsserie beschrieben werden.

Das Gewebe wurde auf einer Apothekerwaage abgewogen und in Weithalsflaschen von ca. 75 ccm Volumen-Inhalt gebracht.

---

[42]) Meyerhof: Pflügers Archiv, 175, 24, 1919.

6 g Gewebe, 12 ccm Phosphatpufferlösung, 6 ccm Wasser, 6 ccm Zusatz.

Die Kontroll- bezw. direkten Versuche enthielten, um die Menge der Suspensionsflüssigkeit gleich zu halten, statt der Zusätze Wasser. Die Phosphatpufferlösung m/10, PH = 7,36, wurde hergestellt durch Auflösung von 1,95 g primärem Natriumphosphat + 2aq (nach Sörensen) und 15,58 g sekundärem Natriumphosphat + 2 aq (nach Sörensen) zu einem Liter Wasser. Der Säuregrad entspricht dem des Blutes.

Als Zusätze dienten 1%ige Lösungen von β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure und α-β-Dioxybuttersäure in Form der Na-Salze. Acetessigsäure wurde nur in einigen Fällen geprüft, da diese Verbindung sehr unbeständig ist und schon rein chemisch im Vakuum in Aceton und CO_2 zerfällt.

Herstellung der Zusätze:

1. β-oxybuttersaures Natrium.

Die β-Oxybuttersäure kommt in reichlicher Menge im Harn der Diabetiker vor. Man kann sie daraus leicht isolieren. Wir stellten sie synthetisch nach folgendem Verfahren her:

100 g Crotonsäure (J. G.-Farben), wurden mit 500 ccm 10%iger Schwefelsäure in einem Kolben im Wasserbad auf Siedetemperatur erhitzt. Sodann wurde der Kolben unter Verschluß einige Tage im Siedebad gelassen, wo durch Wasseranlagerung an die Crotonsäure die β-Oxybuttersäure gebildet wurde.

$$CH_3 . CH = CH . COOH + H_2O \rightleftarrows CH_3 . CHOH . CH_2 . COOH$$

Diese Eigenschaft besitzen ja bekanntlich alle ungesättigten Säuren, z. B. Fumarsäure, die durch Wasseranlagerung in Aepfelsäure umgewandelt wird. Die Umwandlung dieser ungesättigten Säuren in die entsprechenden Oxysäuren ist nicht quantitativ, es stellt sich vielmehr ein Gleichgewicht ein. Der Gleichgewichtszustand zwischen β-Oxybuttersäure und Crotonsäure ist ungefähr erreicht bei einem Verhältnis von 1 Teil Crotonsäure zu 3 Teilen β-Oxybuttersäure. Wie alle synthetisch hergestellten Verbindungen ist die so entstandene β-Oxybuttersäure optisch inaktiv, besteht aus einem Gemisch gleicher Teile rechts und linksdrehender Säure, während die aus dem Harn gewonnene optisch aktiv ist und nach links dreht. Durch das

Erhitzen mit 10%iger Schwefelsäure tritt eine teilweise Zersetzung der Crotonsäure bezw. β-Oxybuttersäure unter Bildung brauner Zersetzungsprodukte auf. Diese lassen sich leicht mit Tierkohle entfernen. Die nahezu farblose Lösung wurde mit 33%iger Natronlauge versetzt, bis mit Dimethylgelb als Indikator der gleiche Farbton erreicht wurde, wie mit einer Vergleichspufferlösung von PH = 3,0. Da die Dissoziationskonstante der β-Oxybuttersäure und auch der Crotonsäure $2{,}1 \cdot 10^{-5}$ ist, $(H\cdot)$ also $= 2{,}1 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\text{freie Säure}}{\text{Salz der Säure}}$ so beträgt bei $(H\cdot) = 1 \cdot 10^{-3}$ der Gehalt an freier Säure

$$\frac{1 \,.\, 10^{-3}}{2 \,.\, 10^{-5}} = \frac{100 \,.\, 10^{-5}}{2 \,.\, 10^{-5}} = \frac{100}{2}$$

98% der Säuren liegen also bei PH = 3,0 als freie Säuren vor, die gesamte Schwefelsäure als Natriumsulfat. Die Lösung wird sodann bei höherer Temperatur im Vakuum eingedampft, bis eine Abscheidung von Na_2SO_4 auftritt. Die Crotonsäure geht hierbei als flüchtige Substanz ins Destillat über. Darauf wird die freie β-Oxybuttersäure mit NaOH gegen Phenolphtalein neutralisiert. In der Lösung befinden sich jetzt die Natriumsalze der Schwefelsäure und β-Oxybuttersäure. Das Natriumsulfat wird mit der doppelten Menge 96%igen Alkohols niedergeschlagen und auf einer Porzellannutsche scharf abgesaugt. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad in der Porzellanschale zur Trockene eingedampft. Zur weiteren Reinigung des β-oxybuttersauren Natriums bedienten wir uns der Vorschrift von Meyerhof[43]). Der Schalenrückstand wurde bei 120° im Trockenschrank getrocknet, mit heißem Alkohol extrahiert, das Filtrat eingeengt und das sich beim Erkalten ausscheidende β-oxybuttersaure Natrium dreimal aus Alkohol umkristallisiert. Das β-oxybuttersaure Natrium enthielt keine ungesättigten Verbindungen mehr, wie die Prüfung nach van Slyke ergab. Es ergibt wie auch Buttersäure bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat-Schwefelsäure keine flüchtigen, bisulfitbindenden Substanzen.

2. Acetessigsaures Kalium.

32,5 g Acetessigester werden mit 15 g Kalilauge in 600 ccm Wasser versetzt und in der Kälte 24 Stunden stehen gelassen. Wir bekamen so eine 5%ige Lösung des Kaliumsalzes der Acetessigsäure, die wir nach entsprechender Verdünnung (20 ccm auf 100 Wasser) für unsere Versuche benutzten. Da die Acetessigsäure wie schon erwähnt eine sehr unbeständige Verbindung ist, konnte diese für Vakuumversuche nicht benutzt werden.

[43]) Meyerhof: Bioch. Zeitschrift 162, 69, 1925.

3. α-β-dioxybuttersaures Natrium.

Die Herstellung des α-β-dioxybuttersauren Natriums geschieht durch Bromierung der ungesättigten Crotonsäure und anschließender Verseifung der Halogenverbindung.

$$CH_3 . CH = CHCOOH + 2\,Br \rightarrow CH_3 . CHBr . CHBr\,COOH \rightarrow CH_3 . CHOH . CHOH . COOH + 2\,NaBr$$

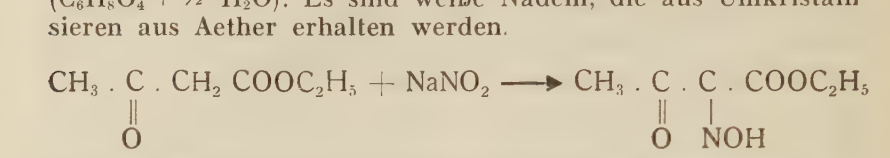
Ein Mol. = 86,05 g Crotonsäure werden mit 159,84 g Brom übergossen. Die braune Farbe des Broms verschwindet durch Anlagerung des Broms an die Doppelbindung der Crotonsäure. Die Säure erhitzt sich zum Schmelzen und erstarrt beim Erhalten zu einer kaum gefärbten Kristallmasse von Crotonsäuredibromid. Nun wird mit 80 g NaOH in 500 H_2O 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht, nach dem Erkalten mit Salzsäure gegen Kongo angesäuert, auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft und mit Aether ausgezogen. Die Säure geht in den Aetherauszug. Es bleibt ein Rückstand von NaCl und NaBr. Dann wird vom Rückstand abfiltriert, der Aether abdestilliert und mit Wasser aufgenommen. Zur Herstellung des Natriumsalzes wird mit Natronlauge erneut gegen Phenolphtalein neutralisiert und auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft, dann in heißem absolutem Alkohol gelöst, mit Tierkohle zur Entfärbung gekocht und zur vollständigen Reinigung dreimal aus heißem Alkohol umkristallisiert.

4. Diketobuttersaures Natrium.

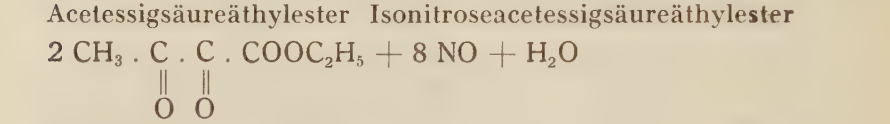
Als Glied in der Kette der Zwischenprodukte des Abbaues von Buttersäure zu Milchsäure hätten wir gern auch die Diketobuttersäure hergestellt. Es wurde folgendes Verfahren angewandt:

Man versetzt eine Lösung von 50 g Acetessigester in 60 g Eisessig unter Kühlung von 0 bis 10° mit einer konzentrierten Lösung von 30 g Natriumnitrit, verdünnt dann mit dem doppelten Volumen Wasser und schüttelt nach mehrstündigem Stehen mit Aether aus. Zur Befreiung des sich gebildeten Isonitrosoacetessigesters von beigemengtem Wasser erhitzt man ihn im Vakuum. Er bildet farblose Säulen. Vom Isonitrosoacetessigester kommt man zunächst zum α-β-Diketobuttersäureäthylester. Dieser entsteht durch Einleiten von trockenen nitrosen Dämpfen (Darstellung durch Einwirken von konzentrierter Salpetersäure auf Arsentrioxyd) auf die ätherische Lösung von α-Isonitrosoacetessigester. Es ist eine orange-gelbe, bewegliche Flüssigkeit,

die begierig Wasser anzieht und damit ein festes Hydrat bildet ($C_6H_8O_4 + \frac{1}{2}\ H_2O$). Es sind weiße Nadeln, die aus Umkristallisieren aus Aether erhalten werden.



Acetessigsäureäthylester Isonitroseacetessigsäureäthylester



Diketobuttersäureäthylester.

Es war nicht möglich, aus diesem Ester durch Verseifung die freie Säure herzustellen. Er zersetzt sich mit Laugen schon in der Kälte, und beim Erhitzen auf ca. 65° bildet er unter CO_2-Abspaltung Milchsäure und Methylglyoxal.

Die Versuche wurden doppelt angesetzt, in der einen Versuchsreihe lediglich die Milchsäure, in der anderen die Gesamtkohlenhydrate bestimmt.

Die Versuchsansätze, bei denen die Mitwirkung von Sauerstoff ausgeschlossen sein sollte, wurden dann mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert und 3 Stunden im Wasserbad von 38° gelassen. Die Versuche, in denen der Einfluß des Sauerstoffes auf Milchsäurebildung und Kohlenhydratabnahme untersucht wurde, wurden gleichfalls zunächst evakuiert und dann mit Sauerstoff aus dem Gasometer gefüllt. Die Sauerstoffversuche wurden auf der Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur 3 Stunden langsam geschüttelt, die diesen Versuchen entsprechenden Vakuumversuche im Wasserbad von Zimmertemperatur gehalten.

Die Fermenttätigkeit wurde in den Milchsäureversuchen durch Zusatz von Sublimat-Salzsäure aufgehoben, in den Gesamtkohlenhydratversuchen durch Zusatz von Salzsäure, bei den direkten Versuchen zu Versuchsbeginn. Die Sublimatlösung wurde hergestellt durch Auflösen von 200 g Sublimat und 100 g NaCl zu 1 Liter Wasser. Von dieser Lösung wurde auf 1 g Gewebe bezogen 1 ccm zugesetzt. Da das hierbei entstehende Mercurialbuminat in einem Ueberschuß von Sublimat löslich ist und sich auf diese Weise das Eiweiß nicht niederschlagen läßt, wurde nach dem Sublimatzusatz eine mit Wasser auf das zehn-

fache verdünnte Salzsäure hinzugegeben und so die komplexe Quecksilbereiweißlösung gesprengt. Eiweiß scheidet sich jetzt quantitativ als Mercurialbuminat ab. Die enteiweißten Versuchsansätze blieben mindestens eine Stunde stehen und wurden dann auf gewöhnlichem Rundfilter in 200 ccm fassende Meßkolben filtriert. Der Eiweißrückstand wurde 4-mal mit 20-fach verdünnter Salzsäure gründlich nachgewaschen. Sämtliche Milchsäure befand sich jetzt im Filtrat, desgleichen Kohlenhydrate, die den Gang der Milchsäurebestimmung stören würden, da sie bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung bisulfitbindende Substanzen liefern.

Die überschüssigen Quecksilbersalze wurden nach Hahn und Fischbach[44]) mit 33%iger NaOH als unlösliches Quecksilberoxyd ausgefällt. Dadurch wurde die umständliche und zeitraubende Entfernung des Quecksilbers als Sulfid mit H_2S unnötig. Gleichfalls erübrigte sich das Einengen im Vakuum des vom Quecksilbersulfidniederschlag befreiten Filtrates, wodurch leicht Verluste an Milchsäure auftreten können, weil Milchsäure mit Wasserdämpfen in geringem Maße flüchtig ist. Ein Ueberschuß an NaOH muß vermieden werden, da bei der nachfolgenden Kupfer-Kalkfällung zur Entfernung der Kohlenhydrate sonst lösliche Kupferkomplexsalze gebildet werden. Es wurde also in der Weise vorgegangen, daß die überschüssige Salzsäure des Filtrates der Sublimat-Salzsäurefällung mit Natronlauge neutralisiert wird, bis eine leichte Fällung von Quecksilberoxyd bestehen bleibt.

Die Kohlenhydrate wurden durch die Kupfer-Kalkfällung entfernt. Dies Verfahren beruht auf früheren Feststellungen Salkowskis[45]). Van Slyke[46]) entfernte auf diese Art bei der Bestimmung der Acetonkörper im Harn den Harnzucker. Hirsch-Kauffmann[47]) wies nach, daß sämtliche die Milchsäurebestimmung störenden Kohlenhydrate, wie Traubenzucker, Glykogen und Hexosephosphorsäure durch Fällung mit Kupfersulfat und Kalkmilch vollkommen entfernt werden und daß diese Methode zu keinem erkennbaren Verlust an Milchsäure führt.

Nach der annähernden Neutralisation der Salzsäure mit Natronlauge wurden 15 ccm einer 10%igen Kupfersulfatlösung und 30 ccm Kalkmilch, die durch Aufschlämmen von 1 kg Aetz-

[44]) Hahn und Fischbach: Zeitschr. für Biol. 89, 149, 1930.
[45]) Salkowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie 3, 79, 1879.
[46]) van Slyke: Journ. of Biol. Chem. 32, 464, 1917.
[47]) Hirsch — Kauffmann: Zeitschr. für physiol. Chemie. 140, 25, 1924.

kalk (CaO Merck) in 5 Liter Wasser erhalten wurde, zum Kolbeninhalt hinzugefügt. Es erfolgt eine Umsetzung in Kupferhydroxyd, das mit den Kohlenhydraten in Gegenwart von Kalkmilch unlösliche Kupfer-Kalkverbindungen gibt. Darauf wurden die Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nach häufigerem Umschütteln nach einer Stunde filtriert.

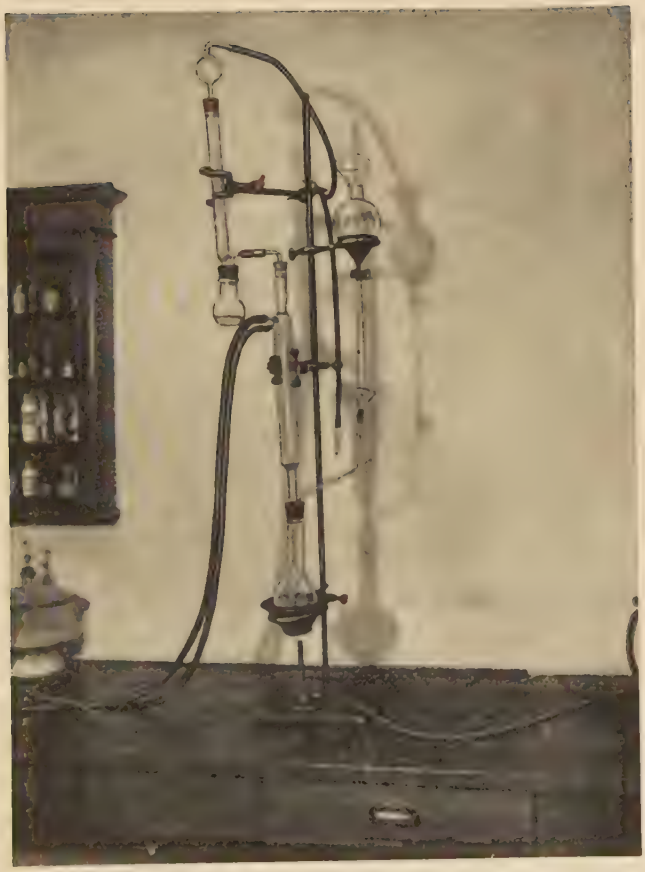
Im Filtrat wurden die Milchsäurebestimmungen in aliquoten Teilen (50 bis 100 ccm) je nach den zu erwartenden Milchsäurewerten nach dem Verfahren von Friedemann, Cotonio und Shaffer[48]) vorgenommen. Das Filtrat ist stets farblos, ein Zeichen dafür, daß keine gelösten Zuckerkupferkomplexverbindungen vorhanden sind.

Das Prinzip des Verfahrens der Milchsäurebestimmung beruht darauf, daß die Milchsäure in mineralsaurer Lösung durch Kaliumpermanganat ausschließlich zu Acetaldehyd oxydiert wird, während in alkalischer und neutraler Lösung als Oxydationsprodukte neben geringen Mengen Acetaldehyd vorwiegend Oxalsäure und Essigsäure auftreten. Der entstehende sehr leicht flüchtige Acetaldehyd wird in eine Vorlage von Bisulfitlösung gesaugt und hier zu Acetaldehyd-Bisulfit gebunden. Das unverbrauchte Bisulfit wird mit Jod gegen Stärke als Indikator titriert. Die Acetaldehyd-Bisulfitverbindung wird mit Natriumbikarbonat gespalten und das freiwerdende Bisulfit erneut gegen Jod titriert. Dabei entspricht 1 Milchsäure = 1 Acetaldehyd = 1 Bisulfit = 2 Jod, mithin 1 ccm n/100 Jodlösung = 0,45 mg Milchsäure.

Die Milchsäurebestimmung wurde in einer zu diesem Zweck konstruierten und geeigneten Apparatur vorgenommen. Es ist zweckmäßig, zuerst eine Beschreibung der Apparatur zu geben.

Sie besteht aus 2 Hauptteilen, einem Kjeldahl-Kolben von 500 cmm Inhalt mit aufgesetzten Kühlrohr und der Vorlage. Der Kjeldahl-Kolben ist mit einem Gummistopfen versehen, der zwei Durchbohrungen hat. Die größere dient zum Aufsetzen eines Dimroth-Kühlers von 35 cm Kühlraumlänge. Durch die zweite engere Durchbohrung führt ein winklig gebogenes Glasrohr, das ca. 10 cm in den Kolben hineinragt. Am oberen Ende dieses Glasrohres befindet sich ein kleiner Trichter, durch den aus einem Tropftrichter verdünnte Kaliumpermanganatlösung n/250 in den Kolben tropft. Der Dimroth-Kühler hat sich vor allen Dingen deshalb als sehr brauchbar erwiesen, weil eine aus-

[48]) Friedemann, Cotonio und Shaffer: Journ. of Biol. Chem. 73, 325, 359, 1927.



Apparat zur Milchsäurebestimmung.

reichende Kühlung von der wasserdurchströmten Glasspirale und dem Mantel gewährleistet wird, während beim einfachen Liebig-Kühler die Kühlung lediglich durch den Mantel erfolgt.

Die Vorlage besteht aus einem 150 ccm fassenden Verseifungskolben, der ebenfalls mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen wird. Unmittelbar unter der einen Durchbohrung endet das Verbindungsrohr zum Kühler, während durch die andere das Verlängerungsrohr eines Absorptionsturmes bis zum Boden des Kolbens führt. Der Absorptionsturm hat eine lichte Weite von 3 cm und eine Höhe von 30 cm. Er ist, um der durchsaugten Luft eine möglichst große Oberfläche zu geben, mit einer 20 cm hohen Schicht von Glasrohrstückchen, deren Längs- und Querdurchmesser = 4 mm ist, gefüllt. Dieses nach dem Prinzip der Raschig-Ringe wirkende Füllmaterial bewirkt, daß die Luft nicht gradlinig durch den Absorptionsturm streicht, sondern ihr ein zickzackförmiger Weg vorgeschrieben ist. Die Absorption des Acetaldehyds durch Natriumbisulfit ist auf diese Weise stets quantitativ, während bei einer Füllung des Turmes mit Glasperlen besonders bei zu schnellem Durchsaugen der Luft leicht Verluste auftreten. Das obere Ende des Absorptionsturmes ist mittels eines Gummistopfens mit einem Tropfenfänger versehen, der mit einem Druckschlauch an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist.

Gang der Bestimmung.

Die Vorlage wird mit 25 ccm einer 0,24%igen Bisulfitlösung gefüllt, die Wasserstrahlpumpe angestellt. Die Lösung wird dadurch um die Glasstückchen gesaugt, wodurch, wie schon erwähnt, eine vollständige Absorption des Acetaldehyd an Bisulfit erreicht wird. Dann wird die Wasserkühlung angestellt. 50 oder 100 ccm des die Milchsäure enthaltenden Filtrates werden in dem Kjeldahl-Kolben mit 15 ccm Mangansulfat-Schwefelsäure (200 g $MnSO_4$ + 1000 ccm aq. dest. + 350 ccm H_2SO_4 konz.) versetzt, an die Apparatur angeschlossen und auf einem Babo-Blech zum Sieden erhitzt. Um ein gleichmäßiges Sieden zu erzielen, wurden einige Tonscherben zur Verhinderung von Siedeverzug hineingetan. In die siedende Lösung wurde dann durch das seitliche Ansatzrohr die Kaliumpermanganatlösung langsam zutropfen gelassen. Es ist sehr darauf zu achten, daß jeder Tropfen sofort entfärbt wird, bis der nächste Tropfen in die Lösung fällt. Das Ende der Reaktion ist dann erreicht, wenn Kaliumpermanganat nicht mehr entfärbt wird und sich als Braunstein abscheidet. Man läßt dann noch 15 Minuten sehr langsam hinzutropfen. Es

ist jetzt der gesamte Acetaldehyd in die Vorlage getrieben und dort als Acetaldehyd-Bisulfitverbindung festgehalten. Jetzt wird die Flamme entfernt, der Aufsatz des Absorpionsturmes heruntergenommen und der Inhalt der Vorlage durch Ausspülen mit dest. Wasser in einen 500 ccm fassenden Verseifungskolben quantitativ übergeführt. Das unverbrauchte Bisulfit wird unter Zusatz von Stärke als Indikator zunächst mit n/10 Jodlösung entfernt, der letzte Rest mit n/100. Sollte man bereits mit n/10 auf Blau titriert haben, so bindet man das überschüssige Jod wieder mit einigen Tropfen Bisulfitlösung und titriert dann das Ende mit n/100. Die Acetaldehyd-Bisulfitverbindung wird dann mit Natriumdikarbonat (ca. 3 g) gespalten, wobei die Blaufärbung der Jodstärke verschwindet. Das dadurch abgespaltene Bisulfit, das dem Milchsäuregehalt entspricht, wird jetzt mit n/100 Jodlösung bis zur beginnenden Blaufärbung der Stärke titriert. 1 ccm n/100 Jod = 0,45 mg Milchsäure.

Die Stärkelösung wurde in der Weise hergestellt, daß 2 g lösliche Stärke (Merck) in 20 ccm dest. Wasser bei Siedehitze gelöst und dann mit 180 ccm bei Zimmertemperatur gesättigter Kaliumchlorid-Lösung verdünnt wurden. Diese Lösung hält sich unbegrenzt lange, während eine rein wässrige Stärkelösung bereits in wenigen Tagen zu Erythrodextrinen abgebaut ist. Der Umschlagspunkt ist dann unscharf.

Das verwendete Natriumbikarbonat darf Jodlösung nicht entfärben, muß also frei von Na_2CO_3 sein. Es muß stets in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt werden. Anstelle von Natriumbikarbonat läßt sich vorteilhaft auch sekundäres Natriumphosphat (Sörensen) verwenden.

Die Milchsäurebestimmung erfordert einige Uebung, liefert dann aber ausgezeichnete Werte.

Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate. (Lesser) [49])

Wie oben angegeben, entsprachen die Versuchsansätze für die Gesamtkohlenhydratbestimmungen denen der Milchsäure. Zur Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate wurde das Gewebe durch 3-stündiges Erhitzen im Wasserbad mit 2 bis 3%iger Salzsäure der totalen Hydrolyse unterworfen, wobei es zu feinen Partikeln zerfällt. Die im Gewebe enthaltenen Kohlenhydrate (Glykogen, Hexosephosphorsäure, Traubenzucker) werden dabei in Glukose überführt. Traubenzucker ist gegen verdünnte Mine-

[49]) Lesser: Bioch. Zeitschrift, 103, 1, 1920.

ralsäure vollkommen beständig. Die zur Hydrolyse notwendige Konzentration wurde in der Weise hergestellt, daß der gesamte Versuchsansatz nach dem 3-stündigen Schütteln bezw. Verbleiben im Wasserbad mit einem Neuntel seines Volumens einer aus gleichen Teilen konzentrierter Salzsäure und Wasser bestehenden Salzsäure versetzt wurde. Die Konzentration der Salzsäure in den Versuchsansätzen beträgt jetzt 2,2%. Sie wurden sodann mit 20-fach verdünnter Salzsäure in Kjeldahl-Kolben von 100 ccm Inhalt übergespült und die Hydrolyse vorgenommen. Die Kolben wurden, nachdem ihr Inhalt die Temperatur des Wasserbades angenommen hatte, mit Gummistopfen verschlossen, um die Konzentration der Salzsäure konstant zu halten. Bei der Hydrolyse des gesamten Gewebes mit Salzsäure treten geringe Verluste an reduzierendem Zucker auf. Sie beruhen nach Lohmann[50]) darauf, daß die im Gewebe enthaltene Hexosemonophosphorsäure in der 3-stündigen Hydrolysezeit zu etwa 20% aufgespalten wird, wobei der reduzierende Zucker zum Teil zerstört wurde. Das Reduktionsvermögen des unzersetzten Esters beträgt zudem nur ⅔ des Reduktionsvermögens der Glukose. Die Verluste sind wie schon erwähnt, nur sehr gering, weil Hexosemonophosphorsäure im Gewebe nur in kleinen Mengen enthalten ist.

Die weitere Aufarbeitung der Versuche wurde anfangs in der Anordnung von Haarmann und Brink[51]) vorgenommen. Der Inhalt der Kjeldahl-Kolben wird hierbei nach dem Abkühlen in 200 ccm-Kolben überführt, mit Phenolphtalein versetzt und mit 33%iger Natronlauge bis zur Rotfärbung des Indikators schwach alkalisch gemacht. Die Rotfärbung wird durch einige Tropfen Eisessig wieder entfernt. Die Ausfällung aller die Zuckerbestimmung störenden Substanzen erfolgte nach Lesser mit einer 20%igen Merkuriacetatlösung. Für 1 g Gewebe sind 1,5 g Merkuriacetat nötig. Die Hydrolysenprodukte des Gewebes, Harnsäure, Creatinin und Phosphate, werden auf diese Weise als unlösliche Verbindungen niedergeschlagen. Nach Auffüllen mit Wasser bis zur Marke wurde zunächst stehen gelassen. Dann wurde die sehr voluminöse Fällung auf einer Porzellannutsche scharf abgesaugt. Man erhielt ca. 180 ccm Filtrat. Die Entfernung des überschüssigen Quecksilbers erfolgte mit Zinkstaub (Merck) als Zinkamalgam. Der Zinkstaub wurde hierbei in kleineren Portionen hinzugefügt und das Ganze gut durchgeschüttelt. Nach Stehen über Nacht wurde erneut Zinkstaub hin-

[50]) Lohmann: Bioch. Zeitschr. 194, 306, 1928.
[51]) Haarmann und Brink: Bioch. Zeitschr. 282, 419, 1935.

zugegeben und dann das Zinkamalgam und der überschüssige Zinkstaub auf der Porzellannutsche abgesaugt. Der gewöhnliche Zinkstaub ist für die Entquecksilberung ungeeignet, weil er zu grobkörnig ist und zu einem großen Teil aus Zinkoxyd besteht. Brauchbar ist nach unseren Erfahrungen lediglich Zinkstaub „Merck." Durch die Entfernung des Quecksilbers mittels Zink erspart man sich die Entquecksilberung der Lösung mit Schwefelwasserstoff, wie es Lesser (l. c.) in seinem Verfahren angibt.

150 ccm der vom Zinkstaub befreiten Lösung werden in 200 ccm Meßkolben mit Natronlauge und Phenolphtalein bis zur Rotfärbung versetzt. Das durch Umsetzung von metallischem Zink mit Quecksilbersalzen entstandene Zinksalz fällt dadurch als Zinkhydroxyd aus. Die Rotfärbung wird durch einige Tropfen gesättigter Zinksulfatlösung wieder beseitigt. Der sehr voluminöse Niederschlag von Zinkhydroxyd schlägt noch Reste der die Zuckerbestimmung störenden Substanzen nieder. Es ist darauf zu achten, daß keine freie Natronlauge vorhanden ist, weil Glukose in alkalischer Lösung zerstört wird. Nach Auffüllen der Kolben auf 200 ccm mit Wasser wird nach öfterem Umschütteln erneut abgesaugt und in 50 oder 100 ccm des Filtrates je nach dem Zuckergehalt die Zuckerbestimmung nach Bertrand[52]) vorgenommen.

Prinzip des Verfahrens.

Das Bertrandsche Verfahren beruht darauf, daß die Glukoselösung Fehlingsche Lösung unter Entstehung von rotem Kupferoxydul reduziert. Das gebildete Kupferoxydul wird in einer Lösung von Ferrisulfat-Schwefelsäure gelöst. Das dabei nach der Gleichung

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 = 2\,CuSO_4 + 2\,FeSO_4 + H_2O$$

entstehende $FeSO_4$ wird mit Kaliumpermanganat titriert. Die Originalvorschrift von Bertrand verwendet 20 ccm Zuckerlösung und je 20 ccm Kupfersulfat- und Seignettesalz - NaOH-Lösung. Die Menge des reduzierten Cu_2O wird hierbei empirisch festgestellt. Bei hohem Glukosegehalt wird auf mg Glukose gerechnet weniger Cu_2O abgeschieden als bei niedrigem.

Da wir bei unseren Versuchen zur Zuckerbestimmung 100 ccm Filtrat benötigen, ist das Verfahren von Bertrand nicht durchführbar, weil in 20 ccm zu wenig Glukose enthalten ist.

---

[52]) Bertrand: Hoppe—Seyler—Tierfelder, Handb. d. physiol. u. path. chem. Analyse, Berlin, Springer, 1924 S. 788.

Sehr brauchbar hat sich die Bestimmung der Glukose nach Meißl und Allihn[53]) erwiesen. Es können hier 100 ccm Filtrat verwendet werden. Das Eindampfen der Lösung auf 20 ccm, wie es für die Bertrandsche Methode notwendig ist, erübrigt sich dadurch.

Im einzelnen wurde die Zuckerbestimmung folgendermaßen vorgenommen:

Die dazu erforderlichen Lösungen waren:

1. Kupfersulfatlösung: 69,278 g $CuSO_4$ ad 1 Liter H_2O
2. Seignette-Salzlösung: 346 g Seignettesalz und 250 g Aetzkali ad 1 Liter H_2O
3. Ferrisulfatschwefelsäure: 50 g $Fe_2(SO_4)_3$ und 200 g H_2SO_4 konz. ad 1 Liter H_2O
   $Fe_2(SO_4)_3$ muß frei von $FeSO_4$ sein, darf also Kaliumpermanganatlösung nicht entfärben. $Fe_2(SO_4)_3$ Merck erfüllt diese Forderung, nicht aber $Fe_2(SO_4)_3$ Riedel — de Haën.
4. n/10 Kaliumpermanganatlösung.

50 oder 100 ccm der Zucker enthaltenden Lösung wurden in einem 500 ccm fassenden Verseifungskolben zum Sieden erhitzt, desgleichen je 30 ccm der Seignettesalz- und Kupfersulfatlösung = Fehlingsche Lösung in 200 ccm Erlenmeyer Kolben. Darauf wurde die siedende Fehlingsche Lösung zu der siedenden Zuckerlösung hinzugegossen. Die Mischung wurde 3 Minuten im Sieden erhalten und sodann mit 150 ccm aqua dest. von Zimmertemperatur versetzt. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wurde anschließend durch Jenaer Glasfiltertiegel 11 G 4 abgesaugt. Der Filterrückstand und der Kolben wurden mit heißem Wasser gründlich nachgewaschen, der Niederschlag mit 30 ccm heißer Ferrisulfatschwefelsäure aufgelöst und das gebildete $FeSO_4$ in einer Porzellanschale mit n/10 Kaliumpermanganatlösung titriert.

1 ccm n/10 Kaliumpermanganat entspricht 6,357 mg Cu. Aus den Kupferwerten werden dann aus der Tafel die Glukosewerte ermittelt. Das entstandene Cu_2O ist stets rot gefärbt und nicht gelb, wie das bei ungenügender Entfernung der die Zuckerbestimmung störenden Substanzen der Fall ist. Im letzeren läßt sich die Lösung nur sehr schlecht und langsam filtrieren, weil die Poren des Filters verstopft werden. Ist im Laufe des Versuches das Quecksilber nicht genügend entfernt, so erfolgt beim

[53]) Meißl und Allihn: Bujard-Baier, Hilfsb. f. Nahrungsmittelchemiker, Berlin, Springer, 1920, S. 42 und 646

Kochen mit der Fehlingschen Lösung eine Reduktion der Quecksilbersalze zu metallischem Quecksilber, sodaß die Werte falsch werden.

Das Verfahren von Haarmann und Brink[54]) gibt an sich sehr genaue Werte, hat aber den Nachteil, daß die Aufarbeitung sehr lange dauert. Es wurde deshalb versucht, ein anderes, einfacheres Verfahren der Gesamtkohlenhydratbestimmung auszuarbeiten, bei dem alle Hydrolysenprodukte des Gewebes durch geeignete Fällungen niedergeschlagen werden, ohne daß im Laufe des Trennungsganges Verluste an Zucker auftreten. Nach vielen vergeblichen Bemühungen kamen wir zu einer brauchbaren Methode, die den Vorteil hat, schneller und eben so genau wie die alte Quecksilbermethode zu arbeiten.

Die Hydrolysenprodukte wurden mit Natriumwolframat in salzsaurer Lösung niedergeschlagen. Da die freie Wolframsäure $H_2WoO_4 \cdot 2\,H_2O$ leicht kolloidale Lösungen bildet, wurden 5 ccm einer 5%igen Kaseinlösung (Hammersten, Merck) gelöst in NaOH zugesetzt. An den endstehenden stark voluminösen Eiweißniederschlag lagert sich die überschüssige kolloidale Wolframsäure leicht und zum größten Teil an. Nach Auffüllen auf 200 ccm mit Wasser wird nach häufigem Umschütteln auf der Porzellannutsche scharf abgesaugt. Im Filtrat befindet sich die gesamte Harnsäure, Creatinin, Zucker neben freier Salzsäure und geringen Mengen von Wolframsäure. Eine Zuckerbestimmung in diesem Filtrat nach Neutralisation der freien Säuren ist noch nicht möglich. Es entsteht beim Kochen mit Fehlingscher Lösung eine Ausfüllung von gelber Wolframsäure, die sich auf dem Jenaer Glasfilter schwer absaugen läßt und die Zuckerbestimmung stört.

Die Wolframate müssen deswegen zuvor entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden 150 ccm des salzsauren Filtrates der Wolframsäure-Kaseinfällung mit 15 ccm gesättigter Zinksulfatlösung und 33%iger Natronlauge gegen Phenolphthalein als Indikator bis zur Rotfärbung versetzt. Die Rotfärbung wurde dann mit einigen Tropfen gesättigter Zinksulfatlöung wieder entfernt. Das gesamte Wolframat wird auf diese Weise als blaues Zinkwolframat niedergeschlagen, das überflüssige Zinksalz als Zinkhydroxyd, durch das auch die gesamte Harnsäure und das Creatinin als unlösliche Zinkverbindungen entfernt werden. Nach Auffüllen auf 200 ccm und Umschütteln wird der sehr dicke Niederschlag auf der Porzellannutsche abgesaugt. Im Filtrat wird

[54]) Haarmann und Brink: Bioch. Zeitschr. 282, 419, 1935.

die Zuckerbestimmung in der oben angegebenen Weise durchgeführt. Die Kupferfällung ist stets rotes Kupferoxydul.

Bei der Ausführung der Zuckerbestimmung nach Entfernung aller störenden Substanzen ist es angebracht, die Bestimmungen möglichst sofort anzuschließen, weil sonst der Zucker in den Lösungen durch die Bakterien der Luft innerhalb kurzer Zeit vollkommen zerstört wird. Arbeitet man die Versuche nicht sofort auf, so muß das Bakterienwachstum durch Hinzufügen von einigen Tropfen Toluol verhindert werden.

Ist wie im Skelettmuskel nur mit geringen Zuckermengen zu rechnen, so muß eine bestimmte Glukosemenge bei der Bestimmung hinzugefügt werden, weil alle Zuckerbestimmungsverfahren mit Hilfe von Fehlingscher Lösung bei zu geringen Zuckermengen ungenau sind. Es wurden in den Fällen 5 ccm einer 1%igen Traubenzuckerlösung hinzugesetzt, der aber nach allen Verfahren quantitativ wiedergewonnen wurde.

Statt mit Fehlingscher Lösung kann die bei der Hydrolyse mit Salzsäure entstehende Glukose auch jodometrisch nach dem Verfahren von Willstätter und Schudel[55]) bestimmt werden.

Die Willstättersche Methode ist nur für Verbindungen anwendbar, die eine freie Aldehydbindung enthalten, Ketoverbindungen, wie z. B. Fruktose, werden von alkalischer Jodlösung nicht angegriffen. Durch Oxydation der Aldehydgruppe zur Karboxylgruppe entsteht die entsprechende Säure, aus Glukose z. B. Glukonsäure nach folgender Gleichung:

$$CH_2(OH) \cdot (CHOH)_4 \cdot C\!\!\begin{array}{l}\diagup\!\!\diagup O \\ \diagdown\!\!\diagdown H\end{array} + J_2 + 3\,NaOH =$$

$$CH_2(OH) \cdot (CHOH)_4 \cdot COONa + 2\,NaJ + 2\,H_2O$$

Die Alkalimenge darf nicht zu gering sein und muß mindestens für die Neutralisierung der entstehenden Säure ausreichen. Die mittels Fehlingscher Lösung und der alkalischen Jodlösung erhaltenen Glukosewerte sind praktisch identisch.

Das Verfahren ist in unserem Falle bei Zusatz von Fettsäure nicht anwendbar, weil die Säuren durch alkalische Jodlösung langsam oxydiert werden. Die Brauchbarkeit des Verfahrens der jodometrischen Bestimmungen des Zuckers soll an folgendem Beispiel gezeigt werden:

12 g Leber wurden in der oben angegebenen Weise in 2,2%iger Salzsäure hydrolysiert, das Hydrolysat mit Wolframsäure aus-

[55]) Willstätter und Schudel: Berichte d. Chem. Gesellsch. 51, 780, 1918.

gefällt und Wolframat mit Zinksulfat-Natronlauge entfernt. In je 50 ccm des Filtrats, entsprechend 2,25 g Leber, wurde die Glukose bestimmt. Verbraucht wurden 32,85 ccm n/10 $KMnO_4$ = 208,8 mg Cu = 107,3 mg Glukose = 4 769 mg auf 100 g Leber.

Zur jodometrischen Bestimmung wurden 50 ccm des Filtrats mit Salzsäure angesäuert und nach Zusatz von einigen Tropfen Stärkelösung mit n/10 Jodlösung bis zur Blaufärbung titriert. Dieser Jodverbrauch = 0,2 ccm entspricht störenden oxydablen Substanzen, wie z. B. Glutathion. Sie gehören nicht zu den Kohlenhydraten. Darauf wird 20 ccm n/10 Jod hinzugesetzt und 25 ccm 33%iger Natronlauge. Die Lösung reagiert alkalisch, das gesamte Jod liegt als Hypojodit und Jodid vor. Man läßt 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, säuert mit Salzsäure an und titriert das nicht verbrauchte Jod mit n/10 Thiosulfatlösung zurück.

Verbraucht wurden 7,95 ccm n/10 Thiosulfatlösung, der Jodverbrauch beträgt mithin 12,05 ccm n/10 Jodlösung.

1 ccm n/10 Jod = 9 mg Glukose.

Daraus ergibt sich auf 2,25 g Gewebe 108,45 mg Glukose oder auf 100 g Gewebe 4820 mg.

Die auf jodometrischem Wege und mittels Fehlingscher Lösung erhaltenen Glukosewerte stimmen also gut überein.

Versuchsergebnisse.

In den Tabellen 1—5 sind die Milchsäurewerte angegeben, die an den verschiedensten Organen von Hund und Katze sowohl unter anaeroben Bedingungen wie auch in Gegenwart von Sauerstoff ohne und nach Zusatz von β-Oxybuttersäure und Dioxybuttersäure erhalten wurden. Die direkten Milchsäurewerte zeigen den Milchsäuregehalt des Gewebes zu Versuchsbeginn an, die übrigen Werte nach 3-stündiger Digestion. Es wurden zunächst die Milchsäurewerte in mg auf 100 g Gewebe angegeben und sodann, der besseren Uebersicht halber, die Differenz gegenüber den direkten Werten gebildet. Wie die Versuche zeigen, hemmt Sauerstoff die Milchsäurebildung aus den im Gewebe vorhandenen Kohlenhydraten sehr stark, unterdrückt sie in vielen Fällen, besonders in Skelett- und Herzmuskel vollkommen. Nach Zusatz von β-Oxybuttersäure bezw. Dioxybuttersäure zeigen die Milchsäurewerte gegenüber der Kontrolle zum Teil eine Steigerung. Die Milchsäurewerte sind bei Zusatz von Dioxybuttersäure meist erheblich höher als bei β-Oxybuttersäure. Die durchschnittliche Milchsäurenachbildung gegenüber der Kontrolle ist im Sauerstoff fast durchweg höher als im Vakuum, ein Zeichen dafür, daß die Umwandlung im Sauerstoff beschleunigt verläuft. Da bei der Umwandlung der Fettsäure in Milchsäure eine Reihe von Dehydrierungsstufen durchlaufen werden, ist diese Feststellung leicht verständlich. Die Umwandlung der Fettsäuren in Milchsäure läßt sich in allen untersuchten Organen nachweisen. Sie ist besonders groß im Skelettmuskel und Herzmuskel. Die einzelnen Organe desselben Tieres sind also zu dieser Umwandlung in verschiedenem Ausmaße befähigt. Das gilt gleichfalls für die gleichen Organe derselben Tierart. Es bestehen wie überhaupt bei biologischen Untersuchungen starke individuelle Schwankungen, die zum Teil durch die Jahreszeit und durch die Ernährung bedingt sind.

In erster Linie sind für diese Schwankungen hormonale Einflüsse maßgebend. Vor allem muß man hier an die Schilddrüse und das Pankreas denken.

In einer Reihe von Fällen tritt nach Zusatz der Fettsäuren keine Vermehrung der Milchsäure gegenüber der Kontrolle auf. Die Ursache könnte einmal sein, daß die Fermente, die die Umwandlung von Fettsäure in Milchsäure bewerkstelligen, unwirksam geworden sind, oder aber, daß sogenannte Ko-Fermente im Gewebe vorhanden sein müssen, die den Vorgang der Umwandlung aktivieren.

Tabelle 1 Hund

Nr.	mg Milchsäure \ 100 g Gewebe				Versuchs-bedingungen	Organ
	direkt	Kontrolle	ß-Oxy-buttersäure	Dioxy-buttersäure		
1	575	579	810	1185	O_2	Muskel
	575	789	891	936	Vakuum	„
	388	382	532	540	O_2	Herzmuskel
	388	632	666	760	Vakuum	„
	256	224	246	256	O_2	Leber
	256	279	301	351	Vakuum	„
	221	210	251	278	O_2	Niere
	221	258	324	356	Vakuum	„
	315	396	446	538	O_2	Milz
	315	420	570	576	Vakuum	„
	258	326	368	474	O_2	Hirn
	258	398	465	488	Vakuum	„
2	432	455	626	678	O_2	Muskel
	432	509	486	690	Vakuum	„
	325	336	375	440	O_2	Herzmuskel
	325	495	590	570	Vakuum	„
	90	164	204	241	O_2	Leber
	90	162	223	261	Vakuum	„
	207	146	216	219	O_2	Niere
	207	173	213	298	Vakuum	„
	420	510	550	630	O_2	Milz
	420	640	690	646	Vakuum	„
	232	188	157	230	O_2	Hirn
	232	251	257	376	Vakuum	„
3	240	310	354	387	O_2	Muskel
	240	340	340	340	Vakuum	„
	168	264	303	308	O_2	Leber
	168	272	240	218	Vakuum	„
4	482	458	543	630	O_2	Muskel
	482	582	586	580	Vakuum	„
	137	142	200	200	O_2	Leber
	137	189	232	222	Vakuum	„
5	250	468	495	555	Vakuum	Muskel
	134	134	161	174	Vakuum	Leber
	134	135	173	179	O_2	„
6	282	390	405	545	Vakuum	Muskel
7	352	390	372	525	O_2	Muskel
	352	392	444	454	Vakuum	„
	258	222	304	298	O_2	Herzmuskel
	258	300	352	506	Vakuum	„
	170	176	207	262	O_2	Leber
	170	211	238	256	Vakuum	„
	103	82	88	170	O_2	Niere
	103	143	136	186	Vakuum	„
	258	216	270	304	O_2	Milz
	258	328	362	357	Vakuum	„
	173	135	147	248	O_2	Hirn
	173	171	185	284	Vakuum	„

Tabelle 2 Hund

Nr.	Milchsäurenachbildung			Versuchsbedingungen	Organ
	Kontrolle	ß-Oxybuttersäure	Dioxybuttersäure		
1	4	235	610	O_2	Skelettmuskel
	214	316	361	Vakuum	„
	— 6	154	162	O_2	Herzmuskel
	244	278	372	Vakuum	„
	— 32	— 10	± 0	O_2	Leber
	23	45	— 95	Vakuum	„
	— 11	30	57	O_2	Niere
	47	113	135	Vakuum	„
	81	131	223	O_2	Milz
	105	255	261	Vakuum	„
	68	110	216	O_2	Hirn
	140	207	230	Vakuum	„
2	23	196	246	O_2	Skelettmuskel
	77	54	258	Vakuum	„
	11	50	115	O_2	Herzmuskel
	170	265	245	Vakuum	„
	74	114	151	O_2	Leber
	72	133	151	Vakuum	„
	— 61	9	12	O_2	Niere
	— 34	6	91	Vakuum	„
	90	130	210	O_2	Milz
	220	270	229	Vakuum	„
	— 44	— 75	— 2	O_2	Hirn
	21	25	144	Vakuum	„
3	70	114	147	O_2	Skelettmuskel
	100	100	100	Vakuum	„
	96	135	140	O_2	Leber
	104	72	50	Vakuum	„
4	— 24	61	814	O_2	Skelettmuskel
	100	104	98	Vakuum	„
	5	63	63	O_2	Leber
	52	95	88	Vakuum	„
5	218	245	305	Vakuum	Skelettmuskel
	± 0	27	40	Vakuum	Leber
	— 1	39	45	O_2	„
6	108	123	263	Vakuum	Skelettmuskel
7	38	20	173	O_2	Skelettmuskel
	40	92	102	Vakuum	„
	— 36	46	40	O_2	Herzmuskel
	42	94	248	Vakuum	„
	6	37	92	O_2	Leber
	46	68	86	Vakuum	„
	— 20	— 15	67	O_2	Niere
	39	33	83	Vakuum	„
	— 42	12	46	O_2	Milz
	70	104	99	Vakuum	„
	— 38	— 26	75	O_2	Hirn
	— 2	12	111	Vakuum	„

Tabelle 3 Katze

Nr.	mg Milchsäure \ 100 g Gewebe				Versuchsbedingungen	Organ
	direkt	Kontrolle	ß-Oxybuttersäure	Dioxybuttersäure		
1	336	366	465	510	Vakuum	Muskel
	144	202	248	374	Vakuum	Leber
2	266	630	705	762	Vakuum	Muskel
	270	262	340	340	Vakuum	Leber
3	594	645	750	760	O_2	Muskel
	594	700	706	785	Vakuum	„
	230	222	226	375	O_2	Leber
	230	260	398	464	Vakuum	„
4	720	730	745	755	O_2	Muskel
	720	675	722	820	Vakuum	„
	274	205	192	362	O_2	Leber
	274	250	286	328	Vakuum	„
5	440	524	470	614	Vakuum	Muskel
	208	258	266	404	Vakuum	Leber
6	760	940	932	1085	Vakuum	Muskel
	185	251	284	376	Vakuum	Leber
7	602	660	678	855	Vakuum	Muskel
	286	266	284	334	Vakuum	Leber

Daß die Fermente in überlebenden Organen eine verschieden lange Lebensdauer besitzen, ist eine bekannte Tatsache, die besonders von Thunberg (l.c.), Ahlgreen[56]) und Hahn und Haarmann (l.c.) näher untersucht wurden. Das Bernsteinsäure abbauende Ferment z. B. bleibt Wochen und Monate, ja selbst Jahre wirksam, während das Apfelsäure abbauende Ferment bereits in wenigen Stunden seine Lebensfähigkeit vollständig eingebüßt hat. Der Gehalt an Bernsteinsäure, Fumar- und Aepfelsäure im Muskel nimmt bei der Lagerung zu, weil die Bildung der Bernsteinsäure noch vonstatten geht, der Abbau der Aepfelsäure aber unterbunden ist. Wird auch nur ein Ferment in der Reaktionskette β-Oxybuttersäure, ⟶ Dioxybuttersäure ⟶ Milchsäure unwirksam, dann wird stets die Milchsäurebildung gegenüber der Kontrolle nicht erhöht sein. Es wäre auf diese Weise aber möglich, Zwischenstufen in der Reaktionskette aufzufinden.

[56]) Ahlgreen: Skand. Arch. 47, 1925, Suppl.

Tabelle 4 Katze

Nr.	Milchsäurenachbildung			Versuchsbedingungen	Organ
	Kontrolle	ß-Oxybuttersäure	Dioxybuttersäure		
1	30	129	174	Vakuum	Skelettmuskel
	58	104	230	Vakuum	Leber
2	364	439	494	Vakuum	Skelettmuskel
	— 8	70	70	Vakuum	Leber
3	51	156	166	O_2	Skelettmuskel
	106	112	191	Vakuum	„
	— 8	— 4	145	O_2	Leber
	30	168	235	Vakuum	„
4	10	25	35	O_2	Skelettmuskel
	— 45	2	100	Vakuum	„
	— 69	— 82	88	O_2	Leber
	— 24	12	54	Vakuum	„
5	84	30	174	Vakuum	Skelettmuskel
	50	58	196	Vakuum	Leber
6	180	172	325	Vakuum	Skelettmuskel
	66	99	191	Vakuum	Leber
7	58	76	253	Vakuum	Skelettmuskel
	10	— 2	48	Vakuum	Leber

Die Milchsäurebildung im Gewebe aus Kohlenhydrat ist, wie aus den Untersuchungen von Meyerhof[57]) und Lohmann[58]) hervorgeht, an die Anwesenheit eines sog. Ko-Fermentes der Milchsäurebildung gebunden. Es besteht nach Lohmann aus Adenylpyrophosphorsäure und Magnesiumsalzen.

Beim Fehlen dieses Ko-Fermentes wird die beim Glykogenabbau entstehende Hexose nicht mit Phosphorsäure verestert, sodaß eine Umsetzung zu Milchsäure nicht stattfinden kann. Auch für den Abbau der Glukose sind Ko-Fermente notwendig, sowohl beim Abbau über die Phosphorsäureester wie auch für die ohne Phosphatbeteiligung. Selbst die Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure ist an die Anwesenheit eines Ko-Fermentes gebunden.

[57]) Meyerhof: Zeitschr. f. physiol. Chem., 101, 165, 1918.
[58]) Lohmann: Bioch. Zeitschr. 237, 445, 1931.

Tabelle 5

Durchschnittliche Milchsäurenachbildung: mg / 100 g Gewebe

Nr.	Kontrolle	ß-Oxy-buttersäure	Dioxy-buttersäure	Versuchs-bedingungen	Organ	Tierart
1	22	125	265	O_2	Muskel	Hund
	122	148	212	Vakuum	„	„
	— 10	83	106	O_2	Herzmuskel	„
	152	212	288	Vakuum	„	„
	25	63	82	O_2	Leber	„
	50	73	88	Vakuum	„	„
	— 31	8	45	O_2	Niere	„
	17	51	103	Vakuum	„	„
	43	91	160	O_2	Milz	„
	132	210	195	Vakuum	„	„
	— 5	3	96	O_2	Hirn	„
	53	81	162	Vakuum	„	„
2	111	137	244	Vakuum	Muskel	Katze
	30	90	100	O_2	„	„
	26	73	146	Vakuum	Leber	„
	— 38	— 43	117	O_2	„	„

Diese Ko-Fermente werden bei der Umsetzung schnell verbraucht. So ist es denn durchaus denkbar, daß bei der Umwandlung von Fett in Zucker gleichfalls Ko-Fermente tätig sind. Werden sie bereits bei der Präparierung der Organe und während des Ansetzens der Versuche unwirksam, dann kann naturgemäß keine Milchsäurebildung aus den Fettsäuren erwartet werden, selbst, wenn die dabei mitwirkenden Fermente ihre Tätigkeit noch besitzen.

Diese Gründe erklären das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Organe und der gleichen Organe derselben Tierart.

Versuchsreihe 2:

Eine erhöhte Milchsäurebildung auf Zusatz von β-Oxybuttersäure und Dioxybuttersäure kann durchaus noch nicht als Beweis dafür gelten, daß tatsächlich die genannten Substanzen in Milchsäure umgewandelt sind. Es könnte sich um eine Anregung der Milchsäurebildung aus den im Gewebe stets vorhandenen Kohlenhydraten durch die zugesetzten Säuren handeln, ohne daß diese selbst verändert würden. Diese Möglichkeit ist nur in den Organen auszuschließen, die praktisch frei von Kohlenhydraten sind.

Das gilt besonders für Hirn, in geringem Umfange für Niere und Milz, während der Skelett- und der Herzmuskel hohe Kohlenhydratreserven aufweisen können. Nach Holmes u. Gerard[59]) macht der Gesamtkohlenhydratgehalt vom Hirngewebe nur etwa 100 mg auf 100 g Gewebe aus. Selbst unter günstigeren Bedingungen verbleibt ein Rest von 60 mg.

Da auch im Hirngewebe eine nicht unerhebliche Milchsäurenachbildung aus β-Oxybuttersäure und besonders Dioxybuttersäure nachweisbar ist, so kann die Mehrbildung gegenüber der Kontrolle nur auf die zugesetzten Fettsäuren bezogen werden. Diese Versuche würden mithin für eine Umwandlung von Fett in Zucker sprechen.

Hieraus ergibt sich, daß wir es in unseren Versuchen mit einer Kombinationswirkung von 2 Milchsäurebildnern zu tun haben. Wie Haarmann[60]) untersuchte, ergeben sich beim Zusammenwirken verschiedener Milchsäurebildner auf die Milchsäurebildung im Gewebe 4 Möglichkeiten. Nur sehr selten wird die aus den einzelnen Milchsäurebildnern nachgebildete Milchsäure bei deren Kombination addiert, wie man rein theoretisch annehmen könnte. In anderen Fällen tritt eine Potenzierung der Milchsäurebildung auf. Am häufigsten wird schließlich eine gegenseitige Hemmung der Milchsäurebildung beobachtet. Es tritt sogar der Fall auf, daß die Milchsäurebildung niedriger ist als ohne Zusatz der Milchsäurebildner.

Im Gewebe besteht also die Kombinationswirkung von Glykogen bezw. Glykose und den zugesetzten Fettsäuren. Bewiesen ist ein Uebergang der Säuren in Milchsäure erst dann, wenn die Milchsäurezunahme größer ist als die Gesamtkohlenhydratabnahme. Dieser Frage galten die folgenden Untersuchungen:

Es wurden hier neben der Milchsäure auch die Gesamtkohlenhydrate bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind aus den Tabellen 6—15 zu ersehen.

Die in den Tabellen angegebenen Werte beziehen sich stets auf die verschiedenen Organe desselben Tieres.

Tabelle 6:

Die Milchsäurenachbildung ist hier im Skelettmuskel in Gegenwart von Sauerstoff besonders hoch. Sie beträgt aus Dioxybuttersäure 610 mg %, aus β-Oxybuttersäure 235 mg %. Dabei ist die Kohlenhydratabnahme nur äußerst gering, fehlt im β-Oxybuttersäureversuch sogar vollkommen und macht im Dioxy-

[59]) Holmes und Gerard: Bioch. Journ. 23, 738, 1929.
[60]) Haarmann: Bioch. Zeitschr. 255, 138, 1932.

Tabelle 6 Hund

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	575	579	810	1185	O_2	Muskel
mg % G.K.H.	378	336	378	336		
Diff. Milchs.	—	+ 4	+ 235	+ 610		
Diff. G.K.H.	—	— 42	± 0	— 42		
mg % Milchs.	575	789	891	936	Vakuum	Muskel
mg % G.K.H.	378	189	296	230		
Diff. Milchs.	—	+ 214	+ 316	+ 361		
Diff. G.K.H.	—	— 189	— 82	— 148		
mg % Milchs.	388	382	532	540	O_2	Herz
mg % G K.H.	785	652	740	666		
Diff. Milchs.	—	— 6	+ 144	+ 152		
Diff. G.K.H.	—	— 133	— 45	— 119		
mg % Milchs.	388	632	662	760	Vakuum	Herz
mg % G.K.H.	785	520	652	666		
Diff. Milchs.	—	+ 244	+ 274	+ 372		
Diff. G.K.H.	—	— 265	— 133	— 119		
mg % Milchs.	256	224	246	256	O_2	Leber
mg % G.K.H.	1780	1780	1820	1750		
Diff. Milchs.	—	— 32	— 10	± 0		
Diff. G.K H.	—	± 0	+ 40	— 30		
mg % Milchs.	256	279	301	351	Vakuum	Leber
mg % G.K.H.	1780	1740	1790	1740		
Diff. Milchs.	—	+ 23	+ 45	+ 95		
Diff. G.K.H.	—	— 40	+ 10	— 40		

buttersäureversuch nur 42 mg % aus. Wir haben es hier also mit einer sehr starken Umwandlung der Fettsäuren in Milchsäure zu tun. Auch in den Vakuumversuchen ist die Kohlenhydratabnahme geringer als die Milchsäurezunahme. In den Versuchen mit Herzmuskel läßt sich gleichfalls ein Uebergang der Fettsäuren in Milchsäure feststellen, nicht aber in den Versuchen mit Lebergewebe.

Tabelle 7:

Sehr eindrucksvoll sind hier besonders die Leberversuche. Wir finden eine gesteigerte Milchsäurebildung und zudem noch

eine Kohlenhydratzunahme. Es ist damit der Beweis erbracht, daß die zugesetzten Fettsäuren direkt Kohlenhydrat bilden.

Nach einer vor kurzem erschienenen Arbeit von v. Euler und Günther [61]) ist eine Resynthese der Milchsäure zu Kohlenhydrat an die Gegenwart einer von von Euler aus Leber gewonnenen Co-Zymase gebunden. Die Co-Zymase besteht aus 1 Molekül Adenin, 1 Molekül Nikotinsäureamid, 2 Molekülen Ribose und 2 Molekülen Phosphorsäure. Die Co-Zymase, die besonders reichlich in der Leber vorkommt, wird von den Leberfermenten, besonders den Phosphatasen leicht angegriffen, sodaß der Co-Zymasegehalt schnell absinkt. Die Co-Zymase dient als Aktivator des Kohlenhydratstoffwechsels, so u. a. zur Wasser-

Tabelle 7 Hund

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	432	455	626	678		
mg % G.K.H.	425	326	326	—		
					O_2	Muskel
Diff. Milchs.	—	+ 23	+196	+246		
Diff. G.K H.	—	— 99	— 99	—		
mg % Milchs.	90	164	204	241		
mg % G.K.H.	268	320	356	356		
					O_2	Leber
Diff. Milchs.	—	+ 74	+114	+151		
Diff. G.K.H.	—	+ 52	+ 88	+ 88		
mg % Milchs.	90	162	223	261		
mg % G.K.H.	268	142	320	550		
					Vakuum	Leber
Diff. Milchs.	—	+ 72	—133	+171		
Diff. G.K.H.	—	—126	— 52	+282		
mg % Milchs.	325	336	375	440		
mg % G.K.H.	965	815	815	815		
					O_2	Herz
Diff. Milchs.	—	+ 11	+ 50	+115		
Diff. G.K.H.	—	—150	—150	—150		
mg % Milchs.	325	640	690	646		
mg % G.K.H.	965	326	445	622		
					Vakuum	Herz
Diff. Milchs.	—	+315	+365	+321		
Diff. G.K.H.	—	—639	—520	—343		

[61]) von Euler und Günther: Zeitschr. f. physiol. Chemie, 243, 1, 1936.

stoffübertragung, zur Phosphorylierung und Kohlenhydratsynthese. Zusatz von Co-Zymase steigert die Kohlenhydratmenge in Leberschnitten nach Laktatzusatz.

Wir können in den Leberversuchen nach den Untersuchungen von v. Euler nur dann eine Zuckerzunahme erwarten, wenn noch wirksame Co-Zymase vorhanden ist. Es ist also notwendig, daß die Leber möglichst schnell verarbeitet wird, um das Unwirksamwerden der Co-Zymase durch Lagerung des Gewebes zu verhüten. Hierauf wurde in unseren Versuchen, weil die Arbeit von v. Euler noch nicht erschienen war, nicht geachtet. Es wurden die einzelnen Organe vielmehr in willkürlicher Reihenfolge nacheinander verarbeitet, sodaß unter Umständen 2 Stunden nach der Tötung des Tieres verstrichen waren, bevor die Leberversuche angesetzt wurden.

Es erklären sich so die starken Unterschiede im Verhalten der einzelnen Leberversuche, einmal sehr starke Zuckerzunahme, dann wieder Fehlen der Zuckerzunahme, ja sogar Zuckerschwund.

Tabelle 8 Hund

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	482	458	543	630		
mg % G.K.H.	610	293	366	268	O_2	Muskel
Diff. Milchs.	—	— 24	+ 61	+148		
Diff. G.K.H.	—	—317	—254	—342		
mg % Milchs.	482	582	586	580		
mg % G.K.H.	610	305	280	318	Vakuum	Muskel
Diff. Milchs.	—	+100	+104	+ 98		
Diff. G.K.H.	—	—305	—330	—292		
mg % Milchs.	137	142	200	200		
mg % G.K.H.	4270	4220	4320	4360	O_2	Leber
Diff. Milchs.	—	+ 5	+63	+63		
Diff. G.K.H.	—	—50	+50	+90		
mg % Milchs.	137	189	232	225		
mg % G.K.H.	4270	4300	4360	4270	Vakuum	Leber
Diff. Milchs.	—	+52	+95	+88		
Diff. G.K.H.	—	+30	+90	± 0		

Im Herzmuskel ist die Milchsäurebildung in allen Fällen geringer als die Kohlenhydratabnahme, sodaß die hier auf Zusatz der Fettsäure nachgebildete Milchsäure auch aus dem Kohlenhydrat des Gewebes stammen könnte.

Tabelle 8:

Die Zuckerzunahme in der Leber ist auch in diesen Versuchen nachweisbar, wenn sie auch geringer ist als in den eben besprochenen. Die Skelettmuskelversuche sind auch hier kein Beweis für die Umwandlung der Fettsäuren in Zucker:

Tabelle 9 — Hund

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	168	264	303	308	O_2	Leber
mg % G.K.H.	4640	4580	4450	4680		
Diff. Milchs.	—	+96	+135	+140		
Diff. G.K.H.	—	—60	—190	+ 40		
mg % Milchs.	168	272	240	218	Vakuum	Leber
mg % G K.H.	4640	4250	4450	4410		
Diff. Milchs.	—	+104	+ 72	+ 50		
Diff. G.K.H.	—	—390	—190	—230		

Tabelle 9:

Eine Zuckerbildung erfolgt nur in Gegenwart von Sauerstoff auf Zusatz von Dioxybuttersäure. In allen übrigen Fällen haben wir eine Kohlenhydratabnahme.

Tabelle 10 — Hund

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	134	134	161	174	Vakuum	Leber
mg % G.K.H.	3620	3660	3960	3960		
Diff. Milchs.	—	± 0	+ 25	+ 40		
Diff. G.K.H.	—	+40	+340	+340		
mg % Milchs.	134	135	173	178	O_2	Leber
mg % G.K.H.	3620	3600	4650	4850		
Diff. Milchs.	—	+ 1	+ 39	+ 45		
Diff. G.K.H.	—	—20	+1030	+1230		

Tabelle 10:

In diesem Versuch wurde lediglich die Leber eines jungen Tieres verarbeitet, weil die übrigen Organe zu klein waren. Die Versuche wurden sofort nach Tötung des Tieres angesetzt. Der Gehalt an Co-Zymase war also hier besonders hoch. Die Zuckerzunahme ist sehr erheblich, und zwar im Sauerstoff ca. 3 mal so hoch wie im Vakuum. Die Milchsäurenachbildung ist aus dem Grunde nur gering, weil eine sofortige Resynthese zu Kohlenhydraten einsetzte. Diese Versuche zeigen, daß auch unter Sauerstoffabschluß eine Zuckersynthese möglich ist, was bislang unbekannt war und auch geleugnet wurde. Man war stets der Ansicht, daß zu diesem Vorgang unbedingt Sauerstoff erforderlich wäre.

Tabelle 11 bis 15.

Die folgenden Versuche wurden an der Katze angestellt.

Tabelle 11 Katze

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	720	730	745	755		
mg % G.K.H.	545	182	122	244		
					O_2	Muskel
Diff. Milchs.	—	+ 10	—423	+ 35		
Diff. G.K.H.	—	—363	+ 25	—301		
mg % Milchs.	720	675	722	820		
mg % G.K.H.	545	307	268	244		
					Vakuum	Muskel
Diff. Milchs.	—	— 45	+ 2	+100		
Diff. G.K.H.	—	—238	—277	—301		
mg % Milchs.	274	205	192	362		
mg % G.K.H.	2520	2480	2680	2840		
					O_2	Leber
Diff. Milchs.	—	—69	— 82	+ 88		
Diff. G.K.H.	—	— 40	+160	+320		
mg % Milchs.	274	250	286	328		
mg % G.K.H.	2520	2400	2550	2440		
					Vakuum	Leber
Diff. Milchs.	—	— 24	+12	+54		
Diff. G.K.H.	—	—120	+30	—80		

In den 5 Versuchen mit Lebergewebe finden wir 4mal eine Zunahme der Gesamtkohlenhydrate, besonders stark nach Zusatz

von Dioxybuttersäure. Im Versuch der Tabelle 12 beträgt die Zunahme an Milchsäure 145 mg % und an Gesamtkohlenhydrat 590 mg % in Gegenwart von Sauerstoff. Unter Sauerstoffabschluß hat lediglich die Milchsäure zugenommen. Auch in dem Versuch der Tabelle 11 tritt nur in O_2 eine Zuckerbildung auf, nicht aber im Vakuum.

Tabelle 12 Katze

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	594	645	750	760		
mg % G.K.H.	440	268	256	242		
					O_2	Muskel
Diff. Milchs.	—	+ 51	+156	+166		
Diff. G.K.H.	—	−172	−184	−198		
mg % Milchs.	594	700	706	785		
mg % G.K.H.	440	290	244	306		
					Vakuum	Muskel
Diff. Milchs.	—	+106	+112	+191		
Diff. G K.H.	—	−150	−194	−134		
mg % Milchs.	230	222	276	375		
mg % G.K.H.	3860	3880	3940	4450		
					O_2	Leber
Diff. Milchs.	—	− 8	+46	+145		
Diff. G.K.H.	—	+20	+80	+590		
mg % Milchs.	230	260	398	465		
mg % G.K.H.	3860	3740	3966	3880		
					Vakuum	Leber
Diff. Milchs.	—	+ 30	+168	+235		
Diff. G.K.H.	—	−120	+100	+ 20		

Der Vorgang der Resynthese vollzieht sich, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, besonders gut in Sauerstoff, kann aber auch im geringen Umfang unter Sauerstoffabschluß erfolgen.

Die Versuche mit Skelettmuskel beweisen nur in der Tabelle 13 besonders nach Zusatz von Dioxybuttersäure, daß hier eine Umwandlung in Milchsäure erfolgt ist. Auch aus den Versuchen der Tabelle 14 läßt sich diese Umwandlung nach Zusatz von β-Oxybuttersäure und Dioxybuttersäure ableiten. Die übrigen Versuche sind nicht beweiskräftig, weil die Kohlenhydratabnahme größer ist, als die Milchsäurebildung, wenn auch die zum Teil recht starke Milchsäurenachbildung ganz im Sinne dieser Umwandlung spricht.

Tabelle 13 — Katze

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	602	660	678	855	Vakuum	Muskel
mg % G.K.H.	316	146	183	268		
Diff. Milchs.	—	+ 58	+ 76	+253		
Diff. G.K.H.	—	—170	—133	— 48		
mg % Milchs.	286	296	284	334	Vakunm	Leber
mg % G.K.H.	5850	5850	5950	6600		
Diff. Milchs.	—	+ 10	— 2	+ 48		
Diff. G.K.H.	—	± 0	+100	+750		

Tabelle 14 — Katze

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	266	630	705	762	Vakuum	Muskel
mg % G.K.H.	622	244	364	305		
Diff. Milchs.	—	+364	+430	+496		
Diff. G.K.H.	—	—378	—258	—317		
mg % Milchs.	270	262	340	340	Vakuum	Leber
mg % G.K.H.	2780	2740	2740	2760		
Diff. Milchs.	—	— 8	+70	+70		
Diff. G.K.H.	—	—40	—40	—20		

Tabelle 15 — Katze

	direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Dioxybutters.	Versuchsbedingungen	Organ
mg % Milchs.	760	940	932	1085	Vakuum	Muskel
mg % G.K.H.	409	208	—	158		
Diff. Milchs.	—	+180	+172	+325		
Diff. G.K.H.	—	—201	—	—251		
mg % Milchs.	185	251	284	6600	Vakuum	Leber
mg % G.K.H.	6450	5960	6050	376		
Diff. Milchs.	—	+166	+ 99	+191		
Diff. G K.H.	—	—490	—400	+150		

Tabelle 16:

Wie im Anfang auseinandergesetzt, lassen sich mit Acetessigsäure im Vakuum die Versuche nicht durchführen, weil hierbei diese Säure rein chemisch zerfällt. Auch unter anderen Versuchsbedingungen zerfällt diese Säure als β-Ketonsäure leicht, sodaß wir nur einige Versuche mit dieser Verbindung anstellten. Sie bildet als Zwischenstufe des Abbauschemas zwischen β-Oxybuttersäure und Dioxybuttersäure Milchsäure. In zwei von den drei angeführten Leberversuchen führt auch sie zu einer Zuckerbildung in der Leber.

Tabelle 16 — Leber O_2

Nr.		direkt	Kontrolle	ß-Oxybutters.	Acetessigsäure	Dioxybutters.	Tierart
1	mg % Milchs.	230	222	226	285	375	Katze
	mg % G.K.H.	3860	3880	3940	4050	4450	
	Diff. Milchs.	—	— 8	— 4	+ 55	+145	
	Diff. G.K.H.	—	+20	+80	+190	+590	
2	mg % Milchs.	134	134	161	164	174	Hund
	mg % G.K.H.	3620	3660	3960	4100	3960	
	Diff. Milchs.	—	± 0	+ 27	+ 30	+ 40	
	Diff. G.K.H.	—	+40	+340	+480	+340	
3	mg % Milchs.	137	142	200	225	200	Hund
	mg % G.K.H.	4270	4220	4320	4100	4360	
	Diff. Milchs.	—	+ 5	+63	+ 88	+ 63	
	Diff. G.K.H.	—	—50	+50	—170	+ 90	

Zusammenfassung.

Es wurde der Mechanismus der Umwandlung von Fett in Kohlenhydrate untersucht. Wahrscheinliche Zwischenstufe auf dem Wege von β-Oxybuttersäure zur Milchsäure ist die Dioxybuttersäure. Sie bewirkt wie die β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure eine Vermehrung der Milchsäurebildung in den überlebenden Organen von Hund und Katze. Die Milchsäurebildung ist größer als die Kohlenhydratabnahme des Gewebes, sodaß die untersuchten Fettsäuren Milchsäurebildner sind. Eine Kohlenhydratzunahme wurde im Lebergewebe nachgewiesen.

Die niederen Fettsäuren unterliegen im Organismus mithin nicht nur einer Oxydation am β-Kohlenstoffatom, sondern auch am α-Kohlenstoffatom. Die β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Dioxybuttersäure sind Zwischenstufen bei der Umwandlung von Fett in Zucker.

Als einzelne Zwischenstufen des Abbaues der Fettsäuren in Zucker dürften wahrscheinlich anzunehmen sein: Buttersäure — Crotonsäure — β-Oxybuttersäure — Acetessigsäure — Dioxybuttersäure — Dioxycrotonsäure — Diketobuttersäure — Methylglyoxal — Brenztraubensäure bezw. Milchsäure — Zucker.

Lebenslauf.

Ich wurde am 11. August 1912 als Tochter des Elektromeisters Karl Schroeder und seiner Ehefrau Paula geb. Brinker in Bielefeld geboren. Von Ostern 1919 bis Ostern 1931 besuchte ich die städtische Cecilienschule in Bielefeld, an der ich Ostern 1931 das Reifezeugnis erhielt. Dann studierte ich 1 Semester an der Universität Freiburg i. Br., die übrigen an der Universität Münster i. W. Naturwissenschaften und Chemie. Am 28. April 1935 bestand ich das 1., am 6. Mai 1936 das 2. Verbandsexamen für Chemiker an der Universität Münster und am 24. Februar 1937 die mündliche Doktorprüfung. Meine Lehrer waren u. a. die Herren Professoren Staudinger, Mie in Freiburg i. Br., Schenck, Ley, G. C. Schmidt, Kaufmann in Münster in Westfalen.

Emmi Schroeder.